

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

## **Analisi della variabilità genetica del gambero viola *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Crustacea, Aristeidae) mediante due loci microsatelliti**

Relatori:

Prof. Alberto CASTELLI

Dott. Ferruccio MALTAGLIATI

Prof.ssa Maria Ines ROLDÁN BORASSI

Candidata:

Erika SEGHESSIO

Anno accademico 2013-2014

## **Sommario**

<b>Riassunto.....</b>	<b>2</b>
<b>1 Introduzione.....</b>	<b>3</b>
1.1 Diversità genetica.....	3
1.2 Genetica della pesca.....	5
1.3 <i>A. antennatus</i> .....	7
1.3.1 Caratteristiche biologiche.....	7
1.3.2 Conoscenza genetica pregressa.....	10
1.4 Distribuzione geografica della specie.....	10
1.5 Pesca di <i>A. antennatus</i> e suo interesse economico.....	11
1.6 Il DNA microsatellite.....	12
1.6.1 Tipologie di microsatelliti.....	14
<b>Obiettivi.....</b>	<b>15</b>
<b>2 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>16</b>
2.1 Campionamento.....	16
2.2 Amplificazione e sequenziamento.....	17
2.3 Assegnazione degli alleli.....	18
2.4 Trattamento statistico dei dati.....	19
2.4.1 Concetti di riferimento e parametri utilizzati.....	19
2.4.2 Test ed analisi effettuati e software utilizzati.....	23
<b>3 RISULTATI.....</b>	<b>30</b>
3.1 Analisi della struttura genetica.....	30
<b>4 DISCUSSIONE.....</b>	<b>35</b>
<b>5 CONCLUSIONI.....</b>	<b>41</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>42</b>
<b>7 RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>52</b>

## Riassunto

I microsatelliti sono brevi tratti di DNA ripetuti, ritrovati in molti genomi, che mostrano un'eccezionale variabilità nell'uomo ed in molte altre specie. Questa variabilità ha fatto dei microsatelliti i marcatori molecolari di scelta per molte applicazioni, come la mappatura genica e gli studi dei rapporti filogenetici e filogeografici tra specie e popolazioni. Il presente studio, svolto presso il Laboratorio di Ittiologia Genetica dell'Università di Girona (Spagna), ha l'obiettivo di stimare la variabilità genetica, attraverso un ampio range di distribuzione, del gambero viola, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), crostaceo decapode appartenente alla famiglia Aristeidae. Lo studio ha riguardato in particolare il Mar Mediterraneo, al fine di contribuire alla definizione degli stock basandosi su criteri genetici. Questo gambero è distribuito prevalentemente su fondali fangosi, tra gli 80 ed i 3300 metri di profondità ed è una delle specie bersaglio più importanti della pesca profonda nell'intero Mediterraneo. Il suo prelievo viene effettuato mediante rete a strascico a profondità generalmente comprese tra i 400 e gli 800 m. Sono stati presi in considerazione campioni provenienti da quattro aree distinte: Mar Mediterraneo Occidentale (aree di pesca di Palamós, di Soller e Golfo del Leone), Mar Mediterraneo Orientale (Mar Ionio), Oceano Atlantico (Faro) e Oceano Indiano (Canale di Mozambico). Utilizzando DNA estratto da tessuto muscolare addominale, sono stati amplificati due loci microsatelliti mediante reazione a catena della polimerasi (PCR), utilizzando primer specifici sviluppati appositamente. I frammenti ottenuti, marcati con fluorocromo, sono stati sequenziati per evidenziare i differenti alleli. Sulla matrice delle frequenze alleliche sono state applicate analisi statistiche mirate a stimare la diversità genetica presente all'interno delle località (ad esempio, la ricchezza allelica e l'eterozigosità attesa), la divergenza genetica tra le località prese in esame e tra i campioni all'interno della stessa (ad esempio, l'indice di fissazione  $F_{ST}$ , analisi molecolare della varianza). I risultati ottenuti dall'analisi genetica hanno mostrato un generale discostamento delle località dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. È stato riscontrato, inoltre, un elevato numero di alleli nei loci presi in esame. In generale, le località considerate non differiscono tra di loro per ciò che concerne i parametri di variabilità genetica. I valori di  $F_{ST}$ , supportati dai risultati ottenuti dall'AMOVA e dall'analisi di assegnazione bayesiana, indicano l'assenza di strutturazione genetica tra le località.

# 1 Introduzione

## 1.1 Diversità genetica

La diversità genetica costituisce il “materiale grezzo” per i cambiamenti evolutivi ed esercita un forte impatto sui livelli superiori (specie, ecosistemi) poiché determina il potenziale di sviluppo di una specie (Templeton *et al*, 2001). La diversità genetica è importante per la sopravvivenza degli esseri viventi perché garantisce la vitalità nel tempo e la capacità di rispondere a differenti caratteristiche, ai cambiamenti ambientali e agli habitat che occupano (Cognetti *et al*, 2004), consentendo ad animali e piante di adattarsi e diversificarsi per sfruttare al meglio le risposte disponibili. Perciò la conservazione della diversità genetica è fondamentale per la protezione della biodiversità.

La diversità genetica è un concetto dinamico, regolato da forze evolutive che modificano nel tempo le frequenze alleliche e genotipiche delle popolazioni naturali. Una popolazione può essere definita come un gruppo di organismi della stessa specie che scambiano regolarmente alleli tra di loro e sono relativamente isolati da altri gruppi di individui della stessa specie. Le principali forze evolutive che influiscono sulla strutturazione genetica di una popolazione sono:

- deriva genetica: cambiamenti casuali delle frequenze geniche di una popolazione.
- mutazione: variazione casuale ereditaria del DNA di un organismo, che introduce nel pool genico nuovi alleli.
- selezione naturale: trasmissione differenziata di genotipi da una generazione all'altra mediante eliminazione di genotipi svantaggiosi da parte dell'ambiente.
- flusso genico: processo responsabile dell'introduzione in una popolazione di nuovi genotipi provenienti da un'altra popolazione.

Deriva genetica, mutazione e selezione naturale inducono differenziazione, il flusso genico, invece, tende ad omogeneizzare le frequenze geniche fra popolazioni.

La diminuzione di variabilità genetica nelle popolazioni naturali si manifesta attraverso:

- modificazioni del flusso genico.
- depressione da inbreeding, ossia diminuzione della fitness a causa dell'accoppiamento tra consanguinei, e da outbreeding, cioè diminuzione della fitness causata da accoppiamenti tra individui di una specie provenienti da diverse popolazioni.
- collo di bottiglia, una drastica riduzione del numero di individui di una popolazione in seguito ad un evento catastrofico, in cui alcuni genotipi possono essere casualmente persi dal pool genico.

Questi fenomeni possono portare, attraverso un impoverimento del pool genico, ad una diminuzione del potenziale evolutivo di una specie, o anche all'estinzione di intere popolazioni. Pertanto, il mantenimento dell'integrità genetica a livello di popolazioni e di specie è essenziale per la sopravvivenza delle stesse. Cambiamenti a livello genetico normalmente precedono quelli a livello di specie, habitat ed ecosistema. Lo studio della diversità genetica fornirà perciò informazioni su ciò che accadrà successivamente a livelli più alti di organizzazione. Innanzitutto è necessario stimare la variabilità genetica naturale in organismi con differenti caratteristiche ecologiche e demografiche, al fine di comprendere su quali scale spazio/temporali gli impatti antropici potrebbero agire.

La mutazione, la selezione naturale e la deriva genetica non sono sufficienti a spiegare come, a partire da una popolazione d'origine geneticamente omogenea, si possa arrivare ad avere due o più popolazioni geneticamente diversificate.

La forza microevolutiva che controlla la distribuzione della diversità genetica fra le popolazioni è il flusso genico, che consiste nello scambio di informazione genetica che avviene tra popolazioni in seguito ai fenomeni migratori di gameti, larve o individui adulti. Il flusso genico tende ad aumentare la diversità genetica all'interno delle popolazioni, perchè porta nuovi alleli da una popolazione all'altra, mentre riduce la diversità genetica fra popolazioni, perchè tende all'omogeneizzazione delle frequenze alleliche. Tutte le condizioni che hanno come effetto la riduzione o l'eliminazione del flusso genico tra popolazioni comportano quindi una diminuzione della diversità genetica entro popolazione ed un aumento della diversità genetica tra popolazioni. Il flusso genico influisce sulle frequenze alleliche delle popolazioni in modo diverso a seconda della sua portata, della sua intensità, della sua durata e della sua direzionalità.

Se il flusso genico all'interno della popolazione d'origine non subisce alcun tipo di restrizione, gli alleli sono liberi di distribuirsi in maniera omogenea; se invece esistono delle costrizioni al flusso genico, la diversità genetica si distribuisce in maniera non omogenea. Nel secondo caso, le normali variazioni delle frequenze alleliche generate dalla mutazione, dalla deriva genetica e dalla selezione naturale non sono libere di diffondersi all'interno della popolazione, ma restano confinate là dove si sono originate. Se le costrizioni che limitano il flusso genico si mantengono nel tempo, la divergenza genetica tende ad aumentare, fino eventualmente a culminare in un evento di speciazione.

In ambiente marino la diversità genetica è distribuita su scale spaziali diverse, che vanno da pochi millimetri a migliaia di chilometri. I pattern di diversità genetica variano in rapporto ai cicli vitali ed alla capacità di dispersione delle specie: specie con elevate capacità dispersive

tendono ad essere meno strutturate geneticamente (grazie all'azione omogeneizzante del flusso genico), mentre le specie con capacità dispersive ridotte tendono ad essere maggiormente strutturate. È stato visto, però, che anche in specie dotate di un elevato potenziale dispersivo possono esistere importanti strutturazioni (Zane *et al*, 2000).

Utilizzando opportuni parametri statistici ed indici matematici ricavati sulla base delle frequenze alleliche stimate all'interno dei campioni è possibile ottenere una valutazione riguardo alla struttura genetica delle popolazioni. Conclusioni sui livelli di correlazione tra popolazioni sono basati sulla similarità genetica tra di esse. Wright (1951) sviluppò la statistica  $F$  come strumento per descrivere i livelli di variabilità genetica all'interno e tra popolazioni basandosi sulla varianza delle frequenze alleliche e i livelli di eterozigosità attesi.  $F_{ST}$  è uno dei parametri interconnessi che serve come guida quantitativa per molte valutazioni della genetica di popolazione ed evolutiva, in quanto poteva essere testata statisticamente da test di permutazione e successivamente comparata con altri lavori (Holsinger e Weir, 2009). Wright (1943) indicò che la divergenza genetica non è trascurabile quando  $F_{ST}$  è minore del 0.05; anche se fosse  $\approx 0.001$ , ma statisticamente significativo, la panmissia non può essere considerata. Attualmente non esiste un accordo sul livello di divergenza genetica che identifichi due sottopopolazioni come separate, per cui le analisi genetiche possono essere usate per valutare se le stime osservate di divergenza genetica siano maggiori o minori rispetto a un valore soglia predefinito (Palsboll *et al*, 2006). È possibile tra le altre cose valutare la presenza di deviazioni dalla panmissia, di fenomeni di inbreeding, di divergenza genetica fra le popolazioni locali ed in generale dei livelli di connettività che sono presenti fra le popolazioni considerate.

## **1.2 Genetica della pesca**

Un grande numero di flotte pescherecce commerciali produttive è collassato nel ventesimo secolo (Allendorf *et al*, 1987). Il pesce ed in secondo luogo molluschi e crostacei rappresentano importanti fonti di proteine per molte culture e il collasso delle flotte non solo minaccia la componente principale della loro dieta, ma mette in pericolo anche la loro stabilità economica e sociale in quanto molti posti di lavoro fanno affidamento sul settore della pesca (Everhart e Young, 1981). Il gambero viola sta alla base di un grande settore economico e sociale nel Mediterraneo, inoltre la conservazione di questa risorsa non è solo importante per il mantenimento della specie stessa, ma per la continuità di un grande settore sociale ed

economico delle località costiere (Lleonart e Maynou, 2003). La gestione della pesca è stata definita come l'applicazione della conoscenza scientifica per ottenere una resa ottimale dei prodotti della pesca commerciale (Everhart e Young, 1981). Coloro che la gestiscono hanno come obiettivo primario la necessità di assicurare la sostenibilità ed evitare l'erosione genetica delle popolazioni (Ward *et al*, 2000). Uno dei ruoli principali per la genetica applicata alla pesca, sia di vertebrati che di invertebrati, è stato e continua ad essere, l'identificazione degli stock, cioè "gruppi semi-discreti di individui di una stessa specie che possiedono definite caratteristiche di particolare interesse per chi ne gestisce la pesca" (Begg *et al*, 1999). Il concetto di stock contiene due principi di base: che gli organismi siano suddivisi in popolazioni locali, che ci siano differenze genetiche tra popolazioni e che queste siano adattative (MacLean e Evans, 1981). È nell'identificazione delle unità riproduttive che le differenze genetiche possono assumere un'importanza pratica. L'assunzione è che all'interno di uno stock dovrebbe esserci una certa omogeneità genetica, ma tra di essi, se questi sono geneticamente isolati, dovrebbe riscontrarsi divergenza genetica nel tempo. Dal punto di vista della genetica della pesca, quindi, il concetto di stock risulta molto simile a quello di popolazione. Siccome la gestione si è sempre interessata dell'immediata fonte di interesse, cioè la taglia e l'abbondanza degli organismi disponibili per lo sfruttamento, la definizione di unità di pesca si è affidata sulle caratteristiche ecologiche e biologiche (Allendorf *et al*, 1987). È stata posta poca attenzione verso la comprensione della genetica di queste popolazioni, che da informazioni su gruppi di organismi ampiamente indipendenti dal punto di vista demografico da altri gruppi (Allendorf *et al*, 1987). Lo sviluppo del campo della biologia e della genetica della conservazione ha richiesto l'aumento di studi genetici in specie di interesse economico per la sua applicazione in piani di gestione dello sfruttamento della risorsa, basata su parametri genetici, che garantiscano la persistenza di uno stock. Tuttavia l'integrazione delle informazioni genetiche nella gestione attuale è lenta e l'inserimento di dati genetici quantitativi ed espliciti nella gestione sono rari (Waples *et al*, 2008), specialmente se le informazioni genetiche contrastano con priorità politiche o economiche (Carvalho e Hauser, 1994). Una prospettiva così limitante potrebbe rivelarsi economicamente vantaggiosa in un breve periodo, però è destinata a fallire la prova del tempo (Allendorf *et al*, 1987). Ci sono svariati esempi in cui la mancata considerazione o applicazione dell'informazione genetica nella delimitazione di stock particolari ha sfociato in un fallimento di gestione, interpretato come sovrasfruttamento o di popolazioni locali (Graves, 1998; Waples *et al*, 2008; Reiss *et al*, 2009). L'analisi della struttura genetica delle specie

bersaglio di pesca è di primaria importanza nello sviluppo di una strategia ottimale per una gestione efficiente.

### **1.3 *Aristeus antennatus***

#### **1.3.1 Caratteristiche biologiche**

*A. antennatus* è un crostaceo di dimensioni medie attorno ai 12 cm, max 20-22 cm, con corpo compresso lateralmente, costituito da una parte anteriore (cefalotorace) ed una posteriore segmentata (addome) (Fig. 1). Il cefalotorace è ricoperto da una robusta corazza dotata di spine (carapace) ed è provvisto di 13 paia di appendici: un paio di antennule, uno di antenne, uno di mandibole, due paia di mascelle, cinque paia di arti per la locomozione (pereiopodi), di cui quattro terminano con una piccola pinza e tre paia di massillipedi utilizzati per il nutrimento. Il cefalotorace è seguito dalla regione posteriore o addome, che è costituita da sei segmenti articolati, lisci ed intersecati longitudinalmente da una piega, di cui i primi cinque sono muniti ciascuno di un paio di appendici per il nuoto (pleopodi) ed il sesto è formato da appendici a lamelle (uropodi) e termina con un ventaglio (telson). L'esoscheletro leggero e i lunghi pleopodi suggeriscono che la specie sia un'abile nuotatrice (Cau *et al*, 2002 ). Il carapace è armato da un rostro munito nella parte superiore di tre denti. Il rostro presenta dimorfismo sessuale (più lungo nelle femmine e nei giovani), particolare che permette l'identificazione del sesso. I grossi occhi sono localizzati lateralmente su un peduncolo sotto il rostro e sormontano l'apparato boccale. La colorazione del corpo è rosso chiara o rosea, con sfumature violacee nella parte superiore del carapace e lungo le giunture dei segmenti dell'addome.



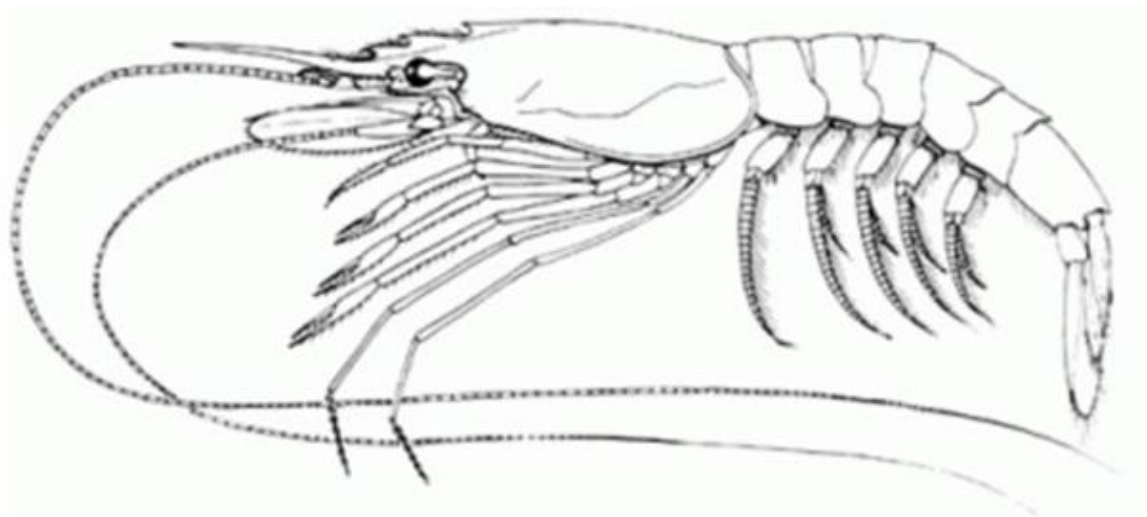


Fig. 1: *Aristeus antennatus*; fonte FAO (<http://www.fao.org/fishery/species/3422/en>).

Tab. 1: Inquadramento sistematico di *A. antennatus* (Grave e Fransen, 2011)

PHYLUM: Arthropoda

SUBPHYLUM: Crustacea

CLASSE: Malacostraca

ORDINE: Decapoda

SUBORDINE: Dendrobranchiata

FAMILIA: Aristeidae

GENERE: *Aristeus*

SPECIE: *A. antennatus*

*A. antennatus* (Fig. 1) (Tab. 1) è una specie nectobentonica che abita i fondi fangosi della scarpata superiore e media, solitamente associata ai canyon sottomarini, presenta un ampio range batimetrico, essendo distribuita da 80 a 3300 m di profondità (Campillo, 1994; Sardà *et al*, 2004).

Gli Aristeidae si riproducono con fecondazione esterna e un petasma aperto conserva e trasferisce le spermatofore (Tavares e Martin, 2010). Maschi maturi possono essere trovati tutto l'anno sebbene la spermatogenesi sia discontinua e avvengano variazioni stagionali nell'attività testicolare (DeSantis *et al*, 1998). Le attività di accoppiamento avvengono dal tardo inverno alla tarda primavera (gennaio-maggio) e la copula sembrerebbe stimolare lo sviluppo dell'ovario e la deposizione, che avviene in estate. Inoltre il ciclo è come segue: sviluppo iniziale dell'ovario, muta, accoppiamento, vitellogenesi e deposizione (Kapisris e Thessalou-Legaki, 2009). *A. antennatus* è un predatore attivo di organismi dell'epifauna e

dell'infauna (bivalvi, policheti, anfipodi e ofiuroidi) (Cartes *et al*, 1989; Chartosia *et al*, 2005) e attua una migrazione notturna verso l'alto lungo la scarpata in cerca di cibo alla quale la loro presenza più superficiale è stata associata (Cartes *et al*, 1993).

La condizione euribatica di *A. antennatus* consente alla specie di adattare la propria densità di popolazione e la struttura alle energie disponibili a diversi intervalli di profondità (Cartes e Demestre, 2003; Sardà *et al*, 2003; Company *et al*, 2008). Sono stati identificati tre diversi strati (< 1000 m, 1000-1500 m e > 1500 m di profondità) con segregazione di densità, sesso e taglia (Sardà *et al*, 2004). Nello strato superiore (< 1000 m di profondità) possono essere ritrovate le più grandi abbondanze (1000 ind/Km<sup>2</sup>), la popolazione è composta principalmente da grandi femmine e la specie attua migrazioni stagionali lungo i canyon sottomarini in relazione alle attività riproduttive (Demestre e Martìn, 1993); è all'interno di questo strato che avviene l'attività di pesca, sono quindi chiamate aree di pesca (Sardà *et al*, 2002). Dal tardo inverno all'inizio dell'estate, la gran parte della popolazione forma banchi allungati a circa 600-800 m sulla scarpata continentale fuori dei canyon ed è composta maggiormente da femmine mature (Tobar e Sardà, 1987). Da metà estate a metà inverno, gli individui si spostano verso l'alto all'interno dei canyon e la pesca avviene lungo la parete della scarpata (Sardà e Cartes, 1993; 1997). In inverno e inizio primavera i maschi sono abbastanza abbondanti nell'area della scarpata, il che potrebbe rendere possibile il contatto con le femmine (Sardà *et al*, 1997). Nello strato intermedio (1000-1500 m) e quello più profondo (> 1000 m), anche chiamati "virgin grounds" poichè non avviene attività di pesca, la densità e la taglia degli individui tende a diminuire (Sardà *et al*, 2002; Sardà *et al*, 2004), mentre aumenta il numero di maschi e forme giovanili fino a raggiungere proporzioni sessuali non diverse da 1:1 (Sardà e Cartes, 1993). Questa distribuzione di individui, congiuntamente al reclutamento che avviene sotto i 1200 m di profondità, suggerisce una risposta alla competizione per il cibo o alla predazione. In realtà, larve di *A. antennatus* sono state trovate solo quattro volte (Heldt, 1954; 1955; Seridji, 1971; Dos Santos, 1998; Carbonell *et al*, 2010) e sempre negli strati superiori, lontano dalle aree di pesca degli adulti, dove potrebbero avere avuto origine (Carbonell *et al*, 2010). Poco è conosciuto degli stadi larvali dopo che le uova vengono rilasciate, però è stato proposto un modello di dinamica riproduttiva per *A. antennatus* basato sulla scoperta di stadi larvali di protozoa II e III, e zoea I vicino alle aree di pesca al largo delle isole Baleari (Carbonell *et al*, 2010). Il modello suggerisce che le larve appena schiuse attuerebbero una migrazione ontogenetica risalendo dalla colonna d'acqua alla superficie, dove la disponibilità di cibo è maggiore e le fasi successive possono svilupparsi con successo (Carbonell *et al*, 2010). Quando la fase decapoda viene raggiunta, avverrebbe

una seconda migrazione verso l'habitat della fase adulta nelle acque profonde (Sardà *et al*, 2004). Tra le due migrazioni le larve potrebbero venire trasportate dalle correnti oceaniche, come anche Carbonell *et al* (2010) trovarono fasi larvali lontane dalle zone di pesca degli adulti.

### **1.3.2 Conoscenza genetica pregressa**

Il primo lavoro genetico che si dedicò alla struttura di popolazione di *A. antennatus* consisteva nell'analisi morfometrica e allozimica di campioni provenienti dal Mar Mediterraneo e dalle acque adiacenti dell'Oceano Atlantico (Sardà *et al*, 1989). Non fu riscontrata nessuna divergenza genetica tra le località, nemmeno tra il Mediterraneo occidentale, quello orientale e l'Oceano Atlantico, però furono osservate differenze morfologiche significative. Quindi, le differenze morfologiche furono attribuite alla plasticità fenotipica della specie (Sardà *et al*, 1998) e alle caratteristiche idrologiche ed ecologiche delle tre regioni studiate (Sardà, 1985).

Nel decennio a seguire, molti autori si sono avvicinati alla genetica di popolazione di *A. antennatus* nel Mediterraneo occidentale, per mezzo di diverse tecniche molecolari. Prima, Roldan *et al* (2009) analizzarono i geni codificanti per il 16S rRNA e la COI, successivamente Maggio *et al* (2009) studiarono la variabilità della regione mitocondriale di controllo (CR) e infine furono sviluppati e applicati dei microsatelliti da Cannas *et al* (2008; 2011). Tutti questi studi individuarono un'assenza di divergenza genetica all'interno del bacino del Mediterraneo occidentale.

Solo il lavoro di Fernandez *et al* (2011), utilizzando marcatori mitocondriali (COI e 16S RNA), è riuscito ad identificare quattro gruppi distinti, imputabili a quattro regioni geografiche distinte (Oceano Atlantico, Mar Mediterraneo occidentale, Mar Mediterraneo orientale e Canale di Mozambico)

### **1.4 Distribuzione geografica della specie**

*A. antennatus* è diffuso nell'intero bacino del Mediterraneo, ad eccezione dell'alto e medio Adriatico ed è presente anche nell'Oceano Atlantico orientale, dal Portogallo al Marocco, fino alle Isole di Capo Verde (Cartes e Sardà, 1992; Sardà e Cartes, 1993); si ritrova inoltre nell'Oceano Indiano occidentale, nel Canale di Mozambico ed alle Isole Maldive (Freitas, 1985) (Fig. 2). Si distribuisce su fondali fangosi fino a 3300 metri di profondità (Sardà *et al*, 2003). All'interno del suo intervallo di distribuzione è ripartito a chiazze, mentre internamente ad esse è continua. Nel Mediterraneo è presente un gradiente longitudinale di

densità (Cau *et al*, 2002), essendo più abbondante nel bacino occidentale, diminuendo via via che si procede verso il bacino orientale. Secondo Sardà *et al* (2009), *A. antennatus* preferirebbe acque relativamente fredde (13.1-13.2°C) e salate (>38.5 psu) e correnti con variabilità moderata.



Fig. 2: Distribuzione geografica di *A. antennatus*: Oceano Atlantico orientale, dal Portogallo alle isole Capo Verde e il Mediterraneo (Cartes e Sardà, 1992; Sardà e Cartes, 1993); Oceano Pacifico occidentale: Mozambico, Zanzibar e isole Maldive (Freitas, 1985)

### 1.5 Pesca di *A. antennatus* e suo interesse economico

La pesca del gambero viola iniziò nel Mar Ligure negli anni '30, divenne il bersaglio della pesca a strascico profonda, grazie alla sua grossa taglia ed all'elevato valore commerciale. Nella decade successiva la pesca si ampliò ad altre zone del Mediterraneo Occidentale come il Mar Catalano e il Golfo del Leone (Sardà *et al*, 2004). Con il miglioramento delle tecnologie dell'industria ittica aumentò anche il numero delle catture fino agli anni '70, quando fu riscontrato il primo collasso nella pesca di *A. antennatus* (Bensch *et al*, 2008) (Fig. 10). Al di fuori dal Mediterraneo, la specie divenne oggetto di pesca negli anni '60, in Portogallo, dove raggiunse livelli di sovrasfruttamento negli anni '90 (Figuerido *et al*, 2001). Nell'Oceano Indiano viene sfruttato principalmente da flotte internazionali, come quella spagnola e quella giapponese (FCP, 2007). Nonostante il gambero viola sia sottoposto ad un'elevata pressione di pesca (circa 2.5 milioni di tonnellate all'anno, FAO

<http://www.fao.org/fishery/species/3422/en>), si ritiene che questa risorsa sia soggetta ad un tasso di prelievo sostenibile. Infatti, la possibilità di mantenere tali livelli di sfruttamento, sembrerebbe dovuta alla distribuzione estremamente ampia della specie sui fondali batiali (Bianchini e Ragonese, 1994) e alla limitata vulnerabilità degli stock di *A. antennatus*, poiché solo la frazione più superficiale dello stock è accessibile alla pesca commerciale (Demestre e Lleonard, 1993; Demestre e Martin, 1993; Sardà *et al.*, 1994). I rendimenti sulla pesca di questo gambero sono tuttavia soggetti a variazioni stagionali, annuali e a fluttuazioni geografiche.

All'interno del Mediterraneo *A. antennatus* è maggiormente catturato nel bacino occidentale, a seguire nel Canale di Sicilia e Mar Ionio. La ricerca genetica applicata all'ambiente marino, riesce in molti casi a colmare alcune lacune lasciate dall'ecologia tradizionale, risultando di conseguenza, un ottimo mezzo di investigazione dello stato di salute delle popolazioni di specie di alto interesse commerciale, ed è quindi in grado di fornire validi strumenti per contribuire ad una politica di gestione di tali risorse più efficace e lungimirante.

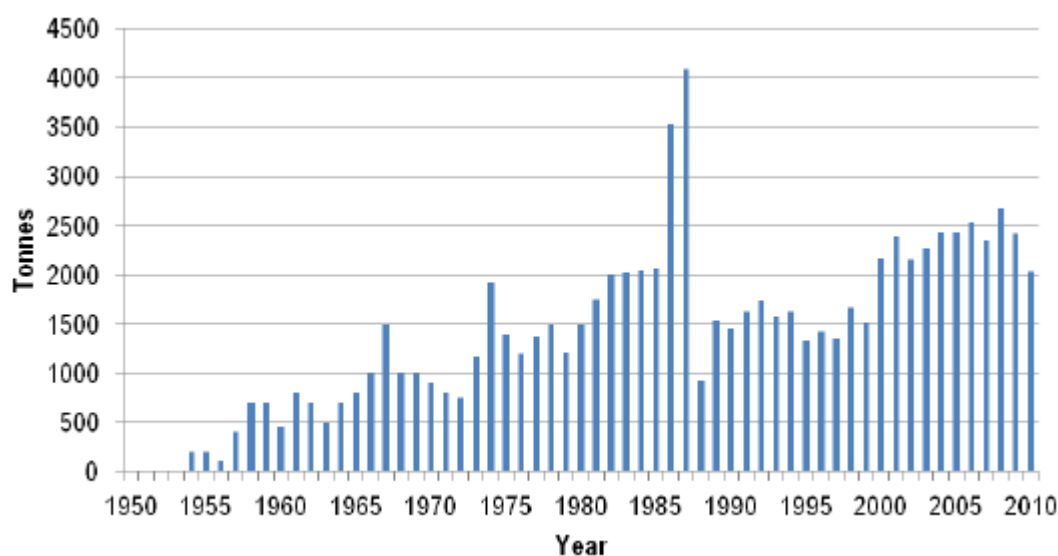


Fig. 3: Catture di *A. antennatus* tra il 1954 e il 2009 secondo la FAO (<http://www.fao.org/fishery/species/3422/en>).

### 1.2.1 Il DNA microsatellite

Chiamati anche SSR (Short Sequence Repeat) (Li *et al.*, 2009) o STR (Short Tandem Repeats) (Gemayel *et al.*, 2010), i microsatelliti sono sequenze di DNA lunghe 2-6 paia di basi (base pair, bp) ripetute in tandem (Tautz e Schlötterer, 1994), di una lunghezza totale minore di 300

bp e che si ritrovano nei genomi di tutti gli organismi eucarioti (Chambers e MacAvoy, 2000). Il numero di ripetizioni varia generalmente tra 5 e 50 volte (DeWoody e Avise, 2000). L'origine dei microsatelliti si pone a partire da regioni del genoma dove si ritrovano, casualmente, sequenze ripetute. In questi casi si può produrre il fenomeno chiamato Slipped-Strand Mispairing (SSM) (Fig. 4), che consiste in un disaccoppiamento tra le due catene di DNA durante la replicazione, producendo accidentalmente lo spostamento di una catena sopra l'altra, andando a formare un loop. Il risultato finale consiste nella perdita o acquisizione di una unità di ripetizione, a seconda che la catena spostata sia quella stampo oppure quella di nuova sintesi, dando luogo rispettivamente ad una espansione o una contrazione della nuova catena di DNA. A causa di questo motivo si producono una moltitudine di alleli per uno stesso microsatellite (Gemayel *et al*, 2010; Katti *et al*, 2001), e in media, il tasso di mutazione di un microsatellite è di  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  per locus per generazione (Schlötterer, 2000). I più polimorfici, e di conseguenza i più utilizzati per molti scopi, sono gli insiemi ininterrotti (Weber, 1990), ma molti loci contengono interruzioni. I microsatelliti possono anche essere composti, cioè combinazioni di insieme in serie o contigui o motivi diversi.

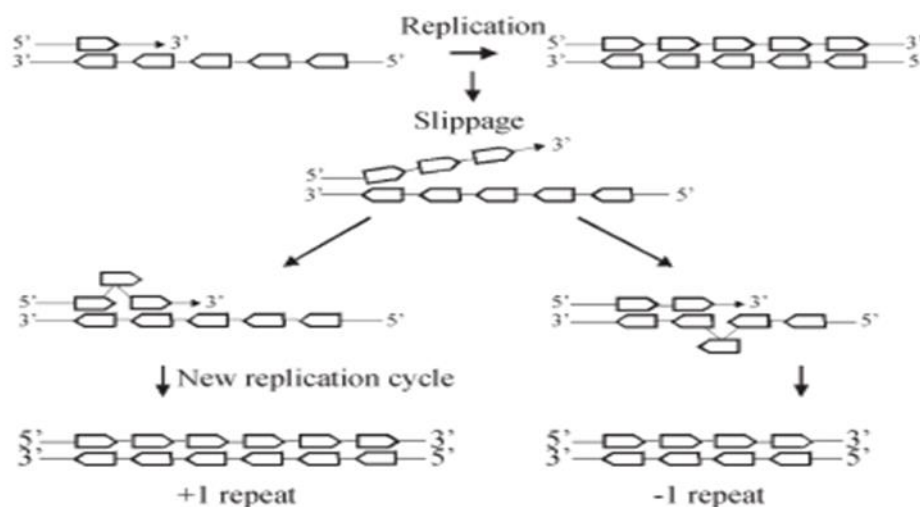


Fig. 4: modello del SSM (Goldsteind e Schlotterer, 1999).

Oltre al fatto di essere sequenze molto abbondanti che presentano un alto grado di polimorfismo (Ball *et al*, 2010; Grover e Sharma, 2011), i microsatelliti presentano altre caratteristiche che li rendono utili come marcatori molecolari: sono codominanti, presentano facilità di uso in laboratorio e hanno un costo relativamente basso. Tutto ciò permette il loro uso come strumento molecolare in diverse analisi genetiche, come per esempio, la costruzione di mappe genetiche e lavori di filogenesi, fiologieografia e genetica di popolazione, (Barker,

2002; Schlötterer e Pemberton, 1994). Dovuto al tipo di polimorfismo dato dalla variazione di dimensione dei frammenti che contengono la ripetizione in tandem, i microsatelliti si possono genotipizzare attraverso la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction). Si generano prodotti amplificati di grandezze diverse a seconda del numero di ripetizioni corrispondenti ai possibili alleli presenti per un locus microsatellite (Katti *et al*, 2001). I primer per la PCR si disegnano utilizzando le regioni che fiancheggiano la ripetizione in tandem, in base al fatto che la sua sequenza è conservata e che il polimorfismo risiede principalmente nel numero di ripetizioni del motivo nucleotidico. In questo modo i differenti alleli si potranno distinguere mediante elettroforesi ad alta risoluzione, che permette di separare frammenti la cui dimensione differisce di anche solo una base.

Il maggior inconveniente per quanto riguarda i microsatelliti è che devono essere isolati *ex novo* da molte specie esaminate per la prima volta. Questo è dovuto al fatto che i microsatelliti sono solitamente trovati in regioni non codificanti dove il tasso di sostituzione nucleotidica è più alto rispetto alle regioni codificanti. Conseguentemente, la strategia di disegnare primer universali che corrispondano alle sequenze conservate è più difficile per questo tipo di marcatori molecolari. Deve essere notato che durante la procedura di isolamento i loci sono selezionati dalla estremità superiore della ripetizione del genoma, la frazione che è risaputo contenga i marcatori più polimorfici (Primmer *et al*, 1996). Inoltre l'elevato polimorfismo osservato in una specie non garantisce che siano ritrovati livelli simili in specie collegate specialmente quando aumenta la distanza evolutiva (Rubinsztein *et al*, 1995; Morin *et al*, 1998).

### **1.2.2 Tipologie di microsatelliti**

Esistono i microsatelliti “perfetti”, che consistono in una ripetizione di un singolo motivo che non è interrotto da una base che non combacia nel modello di ripetizione (es.: CTCTCTCTCTCTCTCTCT); altra categoria sono i microsatelliti “imperfetti”, nei quali una o più ripetizioni portano una base che non si adatta alla struttura di ripetizione (es.: CTCTCTCTGCTCTCTCTCT); in seguito ci sono i microsatelliti “interrotti” dove troviamo l'inserzione di un piccolo gruppo di basi che non si adattano alla struttura (es.: CTCTCTCTGGGCTCTCTCTCT) ed infine i microsatelliti “composti” che consistono in di due o più microsatelliti adiacenti con motivi di ripetizione diversi (es.: CTCTCTCTCTGATGATGATGAT).

Le ripetizioni più diffuse sono i di-, tri- e tetra-nucleotidi. I loci microsatelliti con motivo dinucleotidico sono usati con maggior frequenza, poiché risultano di più facile isolamento, data la maggiore densità di presenza (in media si trova una ripetizione di dinucleotidi ogni 30-50 kb), e hanno una media di ripetizioni per locus minore di 30 (Jarne e Lagoda, 1996). Le ripetizioni dinucleotidiche più frequenti sono CA (particolarmente diffusa negli animali) e TG (Beckmann e Weber, 1992), che mostrano una frequenza doppia rispetto al dinucleotide AT e tripla rispetto alla coppia AG. Tra i trinucleotidi, invece, i motivi più comuni sono CAG e AAT; infine GATA e GACA sono gli unici motivi di tetranucleotidi finora individuati (Jarne e Lagoda, 1996).

### **Obiettivi**

La conoscenza pregressa sulla genetica di popolazione e sulla filogeografia del gambero viola *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Crustacea, Aristeidae) è piuttosto scarsa, a dispetto della sua importanza economica. I dati genetici apportano informazioni importanti per pianificare le misure di gestione e le strategie di conservazione delle specie con un interesse commerciale. L'obiettivo di questo lavoro è approfondire la conoscenza di questa specie, mediante l'impiego di marcatori molecolari, in un contesto biologico ed ecologico. Per fare ciò, sono stati sviluppati marcatori microsatellitari specie-specifici per stimare la variabilità e la divergenza genetica tra campioni locali raccolti su un'ampia scala geografica, al fine di contribuire alla quantificazione della variabilità genetica presente ed all'identificazione degli stock genetici.



## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Campionamento

Un totale di 262 individui di *A. antennatus* sono stati raccolti in 6 località all'interno di 4 regioni: Oceano Atlantico (AO), Mar Mediterraneo Occidentale (WM), Mar Mediterraneo Orientale (EM) e Oceano Indiano (MOZ). I campioni di Faro (AO) e Palamos (WM) sono stati ottenuti da pescatori locali. Il campione di Soller proveniva dalle indagini dell'Istituto Spagnolo di Oceanografia, quelli del Golfo del Leone e del Mar Ionio sono stati ottenuti nell'ambito della campagna oceanografica MEDITS08, mentre quelli del Oceano Indiano nell'ambito della campagna oceanografica MOZ0308 (Istituto Spagnolo di Oceanografia) svoltasi nel Canale di Mozambico (Tab. 1) (Fig.5).

**Tab. 1:** località e data di campionamento, coordinate geografiche, numero di individui per campione.

<b>Località</b>	<b>Data</b>	<b>Lat</b>	<b>Long</b>	<b>N</b>
<b>FAR</b>	01/06/2007			37
<b>SOL</b>	16/10/2008	39°44' N	02°09' E	44
<b>PAL</b>	28/06/2008			59
<b>GDL</b>	09/07/2009	42°35' N	04°13' E	50
<b>ION</b>	04/08/2008	37°37' N	21°03' E	38
<b>MOZ</b>	06/06/2008	17°32' S	38°29' E	34

A ciascun animale é stata asportata, con il bisturi, una sezione di tessuto muscolare addominale. I campioni di tessuto muscolare venivano poi trasferiti con pinzette in provette contenenti etanolo al 70%. Per evitare di contaminare i tessuti prelevati, i bisturi e le pinzette venivano accuratamente puliti con alcol prima di ogni prelievo.



Fig. 5: siti di campionamento di *A. antennatus*.

## 2.2 Amplificazione e sequenziamento

Nel presente lavoro sono state utilizzate due differenti miscele di reazione per i diversi microsatelliti: Aa00138 e Aa00681. Per il primo microsatellite la master mix di un volume di 19.5  $\mu$ l conteneva per ogni individuo 1  $\mu$ l di DNA template, 2  $\mu$ l di Buffer (Applied Biosystem), 2  $\mu$ l di dNTP (10 mM), 2  $\mu$ l di una Mix per i primers composta da 20  $\mu$ l per il primer Reverse (10  $\mu$ M), 0.5 di primer Forward marcato con  $\mu$ Fam (10 $\mu$ M), fluorocromo e H<sub>2</sub>O per portare ad volume finale di 100  $\mu$ l, 1  $\mu$ l di MgCl<sub>2</sub> (10  $\mu$ M), 0.4  $\mu$ l di  $\mu$ Fam, 0.1  $\mu$ l di Taq Dna polimerasi. Per il secondo invece il volume finale della miscela era di 20  $\mu$ l, conteneva 1  $\mu$ l di DNA template, 2  $\mu$ l di Buffer (Applied Biosystem), 2  $\mu$ l di dNTP (10  $\mu$ M), 2  $\mu$ l di una Mix per i primers composta da 20  $\mu$ l per il primer Reverse (10  $\mu$ M), 0.5  $\mu$ l di primer Forward marcato con  $\mu$ Fam (10  $\mu$ M), fluorocromo e H<sub>2</sub>O per portare a volume finale di 100  $\mu$ l, 0.6  $\mu$ l di MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 0.4  $\mu$ l di  $\mu$ Fam 0.1  $\mu$ l di Taq Dna polimerasi. Normalmente vanno incontro a tre fasi: vengono portate ad una temperatura compresa tra 94 e 99 °C. Ci si trova, di conseguenza, in una situazione in cui la doppia elica del DNA viene completamente scissa ed i due filamenti di cui essa è composta sono liberi (fase di denaturazione). Successivamente la temperatura viene abbassata fino a 50-55 °C circa, al fine di permettere l'attacco dei primer alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA template denaturati (fase di annealing). Infine la temperatura viene alzata fino a 65-72 °C al fine di massimizzare l'azione della DNA polimerasi che determina l'allungamento dei primer

legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA (fase di prolungamento). Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 20-30 volte. In genere non si superano i 50 cicli in quanto ad un certo punto la quota di DNA ottenuto raggiunge un plateau. Ciò avviene, ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi o per diminuzione dei dNTP. Le reazioni della PCR sono state condotte nel termociclatore MJ Research PTC-200 seguendo il programma MICROS; questo prevede una fase iniziale di denaturazione di 3 minuti a 94 °C, seguito da 35 cicli comprendenti una fase di denaturazione di 30 secondi a 94 °C, una fase di annealing e una fase di estensione di 1.5 minuti a 72 °C con una estensione finale di 5 minuti a 72°C (Saiki *et al*, 1988). La fase di annealing differisce per i due microsatelliti, il tempo rimane uguale, 1.5 minuti, ciò che cambia è la temperatura, per il primo avviene a 50°C, mentre per il secondo a 60°C. A seguito di amplificazioni senza successo ripetute nel tempo sono state effettuate nuove estrazioni di DNA seguendo il protocollo del fenolo-cloroformio per gli individui che mostravano problemi, per verificare che la causa non fosse da imputare all'età delle estrazioni di partenza, con le nuove estrazioni si è proceduto a portarle a concentrazioni di 250 ng/μl e da questa sono state effettuare ulteriori diluizioni al 50, 25 e 12.5 %. Le diluizioni al 12.5% (≈30 ng/μl) si sono dimostrate essere quelle con risposte più soddisfacenti. È stato modificato anche il protocollo di amplificazione per quanto riguardava la quantità di MgCl<sub>2</sub>, per il secondo locus la condizione di partenza prevedeva l'utilizzo di 0.6 μl, è stato aumentato ad 1.0 μl e 1.5 μl, senza però mostrare miglioramenti effettivi.

Sono stati inoltre allestiti un controllo positivo, che consiste in un campione in cui la sequenza bersaglio è contenuta e un controllo negativo, cioè un campione in cui la sequenza bersaglio manca. Essi servono per evidenziare eventuali contaminazioni che potrebbero riferirsi sia all'estrazione del materiale genomico, sia ad una delle fasi di preparazione della PCR. I frammenti amplificati sono stati verificati attraverso il sequenziatore *ABI PRISM 3130* Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Il termine elettroforesi indica la migrazione differenziata di molecole elettricamente cariche all'interno di un campo elettrico. Molte molecole di interesse biologico possiedono gruppi ionizzabili, cosicché queste possono esistere in soluzione sia come cationi che come anioni. Per la corsa elettroforetica capillare si utilizza un sequenziatore automatico, con capillari in silice fusa riempiti con una sostanza che funge da “setaccio molecolare”: il polimero. Il funzionamento è il seguente: una piccola quantità di soluzione contenente il campione viene introdotta dall'estremità anodica di un capillare contenente un tampone appropriato. L'introduzione si ha applicando una differenza di pressione fra le estremità del capillare, mentre per la separazione viene applicata una

differenza di potenziale tra le due estremità del capillare. Le molecole del campione cominciano quindi a migrare con velocità differenti lungo il capillare, e la migrazione elettroforetica vede lo spostamento dei cationi (+) verso il catodo (-), mentre gli anioni(-) si muovono verso l'anodo (+). Nel capillare si trova una finestra attraverso la quale passa un laser che eccita il fluorocromo permettendo, così, l'emissione e la rilevazione di un segnale. Frammenti più piccoli migrano attraverso le maglie della resina più velocemente, escono prima dal capillare e vengono intercettati per primi dal sistema di rivelazione.

Come opportuno "ladder" di riferimento è stata utilizzata la GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard. Per essere sottoposte al sequenziamento 3 µl di DNA amplificato venivano inseriti all'interno di una piastra contenente 96 pozzetti da caricare ciascuno con il DNA, 15 µl di formammide e 0.3 µl di LIZ.

## **2.3 Assegnazione degli Alleli**

I dati grezzi ottenuti dalla genotipizzazione al sequenziatore sono stati elaborati mediante l'utilizzo del programma *GeneMapper* 4.0 (Applied Biosystem) che permette di visualizzare, in un grafico bidimensionale, l'elettroferogramma, le varianti alleliche del microsatellite sotto forma di picchi di fluorescenza. I picchi che corrispondono alle varianti alleliche vengono etichettati dall'operatore, ottenendo la dimensione del frammento (in paia di basi) confrontando i prodotti in esame con la LIZ.

## **2.4 Trattamento statistico dei dati**

Di seguito è riportata una panoramica (seguendo Procaccini e Maltagliati, 2003) dei principali parametri calcolati per l'analisi dei dati genetici.

### **2.4.1 Concetti di riferimento e parametri utilizzati**

Il linkage disequilibrium (LD) è l'associazione di alleli a due o più loci presente più frequentemente di quanto atteso sulla base delle frequenze dei sigoli alleli. Può assumere valori positivi o negativi ed è contrastata dalla ricombinazione: di conseguenza, decresce ad ogni generazione che deriva da accoppiamenti casuali. Casi di LD permanente si possono avere grazie alla selezione naturale se, ad esempio, alcune combinazioni gametiche risultano avere un successo riproduttivo più alto rispetto ad altre combinazioni. In generale, quando

fra due loci non è presente linkage disequilibrium, questo indica che la frequenza di ricombinazione è elevata e che i due loci possono essere trattati come indipendenti (si ritrovano su cromosomi diversi o sul medesimo cromosoma a distanza necessaria per segregare indipendentemente).

La legge di Hardy-Weinberg (Hardy, 1908; Weinberg, 1908; Stern, 1943) prevede che, in una situazione di stabilità dopo una generazione di accoppiamento casuale, le frequenze genotipiche all'interno di una popolazione a livello di uno specifico gene raggiungano un valore di equilibrio.

Se consideriamo la presenza di solamente due alleli, A e a, con frequenza allelica p e q rispettivamente, i tre possibili genotipi sono AA, Aa e aa e le loro frequenze seguono l'espansione binomiale dell'equazione:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

La frequenza del genotipo AA sarà, quindi,  $p^2$ , quella del genotipo Aa sarà  $2pq$  e la frequenza del genotipo aa sarà, infine,  $q^2$ .

Le popolazioni sono considerate in equilibrio di Hardy-Weinberg quando soddisfano l'equazione, quindi quando omozigoti ed eterozigoti sono nelle proporzioni sopra indicate.

Le frequenze alleliche di un determinato pool genico rimangono costanti solo se vengono soddisfatte le seguenti condizioni restrittive: la popolazione deve essere infinitamente ampia e deve vivere in un ambiente completamente isolato (dove cioè non avvengono fenomeni migratori); inoltre, al suo interno ogni individuo ha la stessa probabilità di riprodursi con qualsiasi altro, non si verificano mutazioni e la selezione naturale non agisce. Il venir meno di una o più di queste condizioni determina un cambiamento delle frequenze alleliche, cioè un'evoluzione.

In natura, è quasi impossibile che una popolazione si trovi in equilibrio di Hardy-Weinberg, in quanto su di essa agiscono diversi fattori, denominati “forze evolutive”, che fanno evolvere gruppi di organismi in popolazioni geneticamente distinte modificandone le frequenze alleliche (Hickman *et al*, 2003). Tali forze sono la deriva genetica, le mutazioni, le migrazioni e la selezione naturale (Gray, 1997): deriva genetica, mutazioni e selezione naturale determinano una differenziazione delle popolazioni, mentre la migrazione le conduce ad un'omogeneizzazione (Gray, 1997). Anche gli accoppiamenti non casuali determinano una deviazione dalla condizione di equilibrio teorizzata da Hardy e Weinberg (Hickman *et al*, 2003). Questi fenomeni, spesso, agiscono in sinergia influenzandosi a vicenda e rendendo più difficile la previsione delle frequenze alleliche (Hickman *et al*, 2003).

L'eterozigosità è, spesso, uno dei primi parametri calcolati a partire da un data set, in quanto solitamente può fornire una grande quantità di informazioni riguardo la struttura e, talvolta, la storia di una popolazione. Per esempio, valori molto bassi di eterozigosità possono indicare effetti acuti sulle popolazioni di piccole dimensioni (effetto “collo di bottiglia”). Generalmente, un valore elevato di eterozigosità è indice di un'ampia diversità genetica, mentre significato contrario è assunto da un basso valore. Di solito, se nel confronto tra l'eterozigosità osservata e quella attesa in equilibrio di HW, l'eterozigosità osservata assume valori minori di quella attesa si tende ad attribuire tale differenza a fenomeni di inbreeding, all'effetto Wahlund o alla presenza di alleli nulli; mentre, se essa risulta maggiore di quella attesa, si tende a imputare tale differenza ad un effetto di isolamento/rottura (mescolamento di due popolazioni precedentemente isolate).

Esistono molti metodi per calcolare l'eterozigosità e, generalmente, essa assume valori compresi tra zero (assenza di eterozigosità) e 1.0 (il sistema presenta un numero elevato di alleli con eguale frequenza). L'eterozigosità attesa,  $H_e$ , è il parametro maggiormente impiegato per descrivere la variabilità genetica intra-popolazione ed è definita come la probabilità che un individuo risulti eterozigote per un determinato locus. Il metodo più semplice per calcolare l'eterozigosità attesa per un singolo locus è:

$$H_e = 1 - \sum p^2$$

dove  $p$  è la frequenza allelica, mentre tra loci è solitamente impiegata l'eterozigosità media. Le eterozigosità ricavate per le singole popolazioni possono essere statisticamente confrontate attraverso il t-test a due code applicato sui valori di ciascun locus trasformati in arcoseno  $\sqrt{x}$  (Archie, 1985).

Se una popolazione si discosta dall'equilibrio di Hardy Weinberg, è più opportuno considerare l'eterozigosità osservata (Archie, 1985):

$$H_o = \text{n. individui eterozigoti} / \text{n. totale individui}$$

In genetica di popolazione, “ $F$ ” sta per “indice di fissazione” e si definisce fissazione l'omozigosità che deriva dall'inincrocio (inbreeding). Wright (1951; 1978) ha sviluppato tre indici di fissazione per valutare la suddivisione delle popolazioni:  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  e  $F_{IT}$ .

$F_{IS}$  è una misura della deviazione delle frequenze genotipiche dalla situazione di panmissia, in termini di deficit o eccesso di individui eterozigoti. Denominato anche “coefficiente di inincrocio” (Weir & Cockerham, 1984), è la probabilità che due alleli in un individuo siano identici per origine (autozigoti). In una singola popolazione è dato da:

$$F_{IS} = 1 - (H_o / H_e)$$

dove  $H_o$  = eterozigosità osservata (rapporto tra individui eterozigoti ed individui totali) e  $H_e$  = eterozigosità attesa. Valori negativi di  $F_{IS}$  indicano outbreeding, ossia un eccesso di individui eterozigoti, mentre valori positivi di  $F_{IS}$  indicano inbreeding, cioè un deficit di eterozigoti rispetto alle attese previste dalla legge di HW.

$F_{IT}$ , usato molto di rado, è il cosiddetto “coefficiente di inincrocio totale” (F) (Weir e Cockerham, 1984) e stima la correlazione dei gameti che si uniscono relativa ai gameti nell’insieme di tutte le popolazioni.

$F_{ST}$  è la misura della riduzione in eterozigosità di una popolazione dovuta alla deriva genetica, causata dalla sua suddivisione in popolazioni. Denominato “coancestry coefficient” da Weir e Cockerham (1984), è definito come la correlazione dei gameti entro le popolazioni relativa ai gameti estratti a caso dall’insieme delle popolazioni ed assume sempre valori positivi. In particolare, può assumere valori compresi tra zero, che indica assenza di suddivisione tra le popolazioni (panmissia), ed 1.0, che indica una situazione di isolamento completo (divergenza genetica estrema). Come regola empirica, valori di  $F_{ST} \leq 0.05$  indicano una trascurabile differenziazione genetica, mentre valori di  $F_{ST} \geq 0.25$  indicano elevata divergenza genetica.

L’analisi della varianza molecolare (AMOVA, Excoffier *et al*, 1992) consente di ripartire la variabilità molecolare tra i fattori gerarchici per i quali sono stati individuate deviazioni significative dall’ipotesi nulla. L’AMOVA si basa sul fatto che la somma dei quadrati in un’analisi della varianza convenzionale può essere scritta come somma delle distanza quadrate tra coppie di fenotipi (Excoffier *et al*, 1992).

L’AMOVA gerarchica ripartisce la varianza totale nei componenti della covarianza dati dalle differenze intra-individuali, tra individui all’interno delle popolazioni e tra le popolazioni.

Dato l’utilizzo dei microsatelliti, nel presente lavoro è stata utilizzata una statistica differente, la statistica rho di Slatkin (1995), che invece di fare riferimento al classico  $\Phi_{ST}$ , impiega  $R_{ST}$ , che prende in considerazione le differenze tra le dimensioni dei diversi alleli. L’utilizzo di aplotipi fittizi porta alla stima corretta di differenziazione nella popolazione, anche se i loci sono statisticamente connessi, in quanto a tutti i loci viene dato lo stesso peso (Weir e Cockerham, 1984).

Il metodo di assegnazione bayesiana sviluppato da Pritchard *et al* (2000) è stato usato per inferire la struttura genetica presente all’interno del dataset. Questo approccio differisce dalle analisi sopradescritte, in quanto gli individui sono assegnati a cluster genetici esclusivamente

in base ai loro genotipi individuali. È stato applicato l'algoritmo di assegnazione basato sul modello al fine di dare visione della struttura genetica all'interno della specie, tramite l'assegnazione degli individui ai cluster genetici. Il modello considera K cluster genetici, rappresentati da popolazioni (o gruppi di popolazioni), sulla base di dati genotipici. Il modello utilizzato è l'admixture model, in cui ciascun individuo proviene puramente da una delle popolazioni K. Lo scopo di questa analisi è di rilevare il numero di cluster genetici (K) che massimizza la probabilità a posteriori dei dati (PPD), o, in altri termini, il minimo valore K che include la struttura più ampia nei dati.

#### **2.4.2 Test ed analisi effettuati e software utilizzati**

La possibile presenza linkage disequilibrium è stata verificata attraverso un test di permutazione con 10000 repliche tra loci, utilizzando il software GENEPOP (Raymond e Rousset, 1995).

Per ciascun locus e per ciascuna popolazione sono stati calcolati inoltre il numero totale di alleli rilevati ed il numero totale di alleli privati, cioè quelli esclusivi di una sola località. Le frequenze alleliche sono state calcolate per ciascun locus e per ciascuna popolazione utilizzando il software GENEPOP.

Sulla base delle frequenze alleliche, le località sono state sottoposte ad un test di permutazione, sempre con 10000 repliche, per verificare l'equilibrio di Hardy-Weinberg (HW) relativo a ciascun locus. Questo test statistico è stato realizzato con il software GENEPOP. Per ciascuna località sono stati calcolati stimatori di diversità genetica come: eterozigosità osservata ( $H_o$ ), eterozigosità attesa ( $H_e$ ) e ricchezza allelica ( $R_a$ ). Il calcolo della ricchezza allelica media è stato ottenuto mediante una procedura di rarefazione dei campioni. Anche questi stimatori sono stati calcolati utilizzando il software GENEPOP. In seguito ad opportuna trasformazione in arcsen ( $\sqrt{x}$ ), i valori di eterozigosità osservata rilevata nei campioni locali sono stati confrontati tramite t-test.

La struttura genetica è stata analizzata con la F-statistica di Weir e Cockerham (1984). Gli indici di inbreeding e fissazione,  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ , sono stati calcolati mediante i software GENETIX (Belkhir *et al.*, 2001) e FSTAT (Goudet, 2001). Il flusso genico tra popolazioni è stato stimato secondo la seguente relazione (Wright, 1943):

$$Nm=0.25 (1-F_{ST})/ F_{ST}$$

Dove Nm corrisponde al numero di migranti efficaci (cioè che si riproducono nella popolazione di destinazione) per generazione.



Per valutare la presenza di isolamento da distanza, che consiste in un aumento della divergenza genetica tra due popolazioni all'aumentare della distanza geografica che le separa (Frantz *et al*, 2009), sono stati usati congiuntamente i dati della divergenza genetica (indicata dai valori a coppia dell'indice  $F_{ST}$ ) e della distanza geografica, calcolata nel presente lavoro come distanza nautica minima tra i porti campionati, utilizzando Google Earth ([www.google.com/intl/it/earth/index.html](http://www.google.com/intl/it/earth/index.html)). Applicando il test non parametrico di Mantel (1967) alla regressione tra le matrici di distanza genetica e geografica è possibile stabilire se si è in presenza di isolamento da distanza: se il coefficiente Z (o coefficiente di Mantel), calcolato a partire dai dati reali e poi comparato alla serie di pseudovalori ottenuti per permutazione di righe (o colonne) di una delle due matrici, risulta essere significativo il test rigetta l'ipotesi nulla di indipendenza delle matrici ed evidenzia, dunque, la presenza di isolamento da distanza. Se le due matrici sono indipendenti il valore di Z ottenuto sui dati reali non si discosta significativamente dalla distribuzione degli pseudo-Z ottenuti con le permutazioni. I valori di probabilità (P) nel presente lavoro sono stati ottenuti mediante 10000 permutazioni.

Sulla matrice delle distanze genetiche di Cavalli-Sforza e Edwards (1967) fra località è stato applicato il Multi Dimensional Scaling (MDS) (Lessa, 1990), questo metodo costruisce una mappa dei campioni – cioè, nel nostro caso, delle località analizzate – in due o tre dimensioni non utilizzando direttamente la matrice di similarità, ma ordinando i campioni per similarità ed assegnando ad essi dei ranghi, che verranno utilizzati come distanze. In linea generale nel considerare una rappresentazione grafica di questo tipo è opportuno fare riferimento ad un coefficiente di stress (s), che indica quanto la rappresentazione grafica risulti attendibile rispetto alla matrice di similarità originaria. Per l'indice di stress generalmente viene indicato un valore limite di  $s = 0.2$ , al di sopra del quale la rappresentazione grafica viene considerata poco accurata. Sono state effettuate due analisi: la prima con tutte le località analizzate, la seconda escludendo la località del Canale di Mozambico. I grafici MDS sono stati prodotti utilizzando il software PRIMER-E (Clarke e Warwick, 2001).

L'analisi della varianza molecolare (AMOVA) è stata eseguita con il software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). È stata effettuata un'analisi includendo tutte le località e la varianza molecolare è stata ripartita all'interno di due componenti: all'interno e fra località.

Attraverso l'approccio statistico di tipo Bayesiano del software STRUCTURE (Pritchard *et al*, 2000), è stata inferita la struttura genetica presente all'interno del dataset. Gli individui sono stati assegnati all'interno di differenti cluster genetici sulla base dei loro genotipi. Il numero massimo di cluster genetici ( $K_{\max}$ ) all'interno dei quali gli individui devono essere assegnati viene stabilito a priori dallo sperimentatore; di solito vengono considerati valori di  $K$  da 1 a  $n+3$ , dove  $n$  è il numero di campioni locali (Evanno *et al*, 2005). Il programma lavora in modo iterativo, ripetendo il procedimento di assegnazione per ciascun valore di  $K$  compreso fra 1 e  $K_{\max}$ , quindi calcola la probabilità a posteriori per ciascuna di queste ripetizioni. Le probabilità a posteriori associate alle varie ripetizioni vengono infine confrontate fra loro per determinare il valore di  $K$  che ha ricevuto il maggior supporto statistico. Per ciascun valore di  $K$  sono state effettuate cinque repliche (burnin: 50000; iterazioni: 100000). Per stabilire il valore di  $K$  da accettare è stato utilizzato il metodo di Evanno *et al* (2005) impiegando il programma on line STRUCTURE HARVESTER (Earl e vonHoldt, 2012).

L'albero filogenetico UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) è stato costruito mediante l'utilizzo del software PHYLIP, in particolare con l'uso del subprogramma FigTree.

Il bootstrap (Efron, 1979) è una tecnica di ricampionamento statistico che stima la distribuzione della statistica considerata. L'idea base del bootstrap riguarda la stima della varianza in una distribuzione sconosciuta dalla quale i dati vengono estratti mediante ricampionamento casuale. Il bootstrap costruisce un numero di data set fittizi. Il processo di ricampionamento viene effettuato  $r$  volte (di solito  $1000 < r < 100000$ ) ottenendo un insieme di  $r$  stime del parametro in questione. In genetica di popolazione è applicato, per esempio, per ottenere l'intervallo di confidenza di parametri quali,  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ ,  $Nm$  ecc. Un'altra importante applicazione in ecologia molecolare ed in sistematica è la valutazione della "robustezza" dei nodi di un albero filogenetico o filogeografico. In questo caso, invece di campionare punti  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , si ha una tabella di popolazioni o di specie per carattere: si applica il bootstrap ai caratteri e, quindi, i caratteri della matrice originale sono ricampionati e rimpiazzati casualmente. Il valore bootstrap riportato sui nodi dell'albero filogenetico indica la percentuale delle volte in cui quel nodo è stato prodotto.

### 3. Risultati

La diversità genetica di *Aristeus antennatus* nell'area di studio è stata stimata analizzando due loci microsatellitari in 262 individui provenienti da località. L'analisi del linkage disequilibrium sui loci non ha restituito nessun risultato significativo. I due loci possono quindi essere trattati come marcatori genetici indipendenti.

Il locus che ha mostrato il numero maggiore di alleli (46) è Aa00681, Aa00138 invece ne conta 45 (Tab. 2). Le località con il maggior numero complessivo di alleli sono Palamos e Mozambico con 55 alleli (di cui rispettivamente 4 e 9 privati) (Tab. 2). La località con il maggior numero di alleli privati è il Mozambico (9), mentre quella che ne presenta il minor numero è il Mar Ionio (1) (Tab. 2) (Fig. 6).

**Tab 2.** Numero di alleli rilevati per locus e per località; gli alleli privati sono riportati tra parentesi.

	FAR	SOL	PAL	GDL	ION	MOZ	TOT
Aa00138	29(3)	26(2)	31(3)	23(1)	27(1)	29(1)	45(11)
Aa00681	14(1)	21(3)	24(1)	23(3)	17	26(8)	46(16)
TOT	43(4)	47(5)	55(4)	46(4)	44(1)	55(9)	

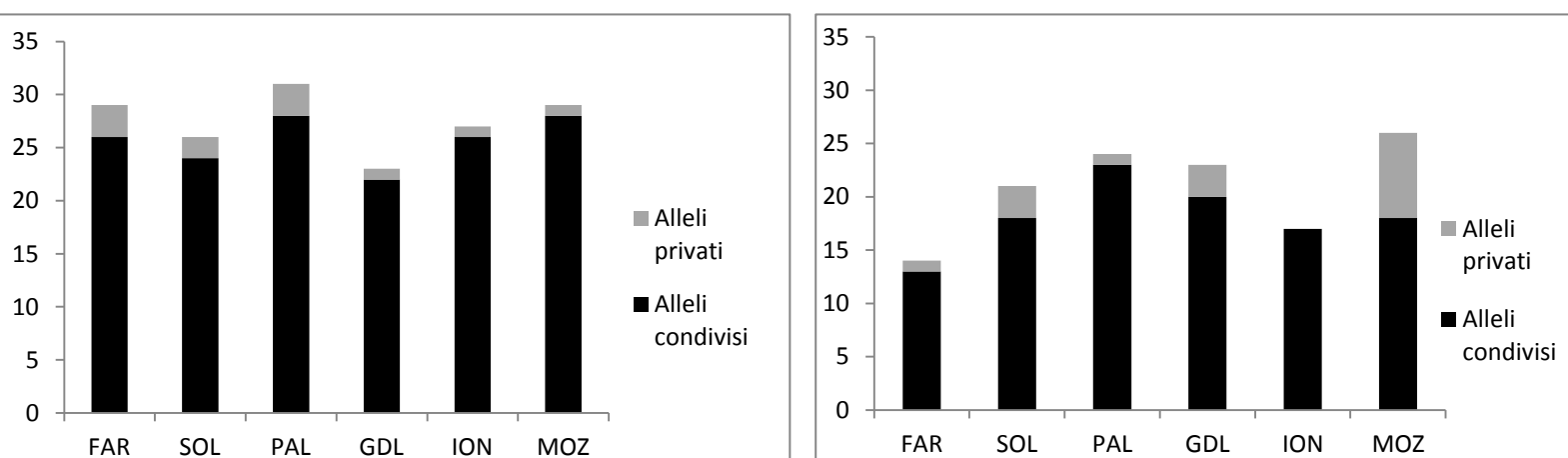


Fig. 6. Istogrammi del numero di alleli rilevati per località, a sinistra relativo al locus Aa00138, a destra quello del locus Aa00681.

Il numero medio di alleli maggiore è stato rilevato nel Canale di Mozambico, mentre quello minore a Faro (Tab. 2). Il valore massimo di eterozigosità media attesa è stato registrato nel Canale di Mozambico, mentre per l'eterozigosità media osservata è stato riscontrato a Palamos (Tab. 3). Il valore minimo di eterozigosità media sia attesa che osservata è stato

registrato per il Golfo del Leone (Tab. 3). La ricchezza allelica media maggiore è stata rilevata per il canale di Mozambico, mentre la minore è stata rilevata nel Golfo del Leone (Tab. 3).

**Tab. 3.** Stime di diversità genetica rilevate nelle località analizzate; Na: numero medio di alleli; He: eterozigosità media attesa; Ho: eterozigosità media osservata; Ra: ricchezza allelica media.

Località	Na	He	Ho	Ra*
FAR	21.500 ± 10.607	0.886 ± 0.086	0.581 ± 0.248	20.907 ± 10.022
SOL	23.500 ± 3.536	0.882 ± 0.059	0.625 ± 0.113	20.837 ± 3.230
PAL	27.500 ± 4.950	0.918 ± 0.034	0.661 ± 0.120	22.644 ± 4.150
GDL	23.000 ± 0.000	0.859 ± 0.044	0.506 ± 0.141	19.809 ± 0.249
ION	22.000 ± 7.071	0.909 ± 0.050	0.632 ± 0.149	21.173 ± 6.689
MOZ	27.500 ± 2.121	0.939 ± 0.001	0.588 ± 0.208	27.500 ± 2.121

\*Stime ottenute in seguito a procedura di rarefazione dei campioni (N=34)

Tutte le località sono risultate deviare significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HW) per entrambi i loci (Tab. 4).

**Tab. 4.** Risultati dei test per la valutazione dell'equilibrio di Hardy-Weinberg. Valori di probabilità ottenuti con test di permutazione (10000 repliche).

	FAR	SOL	PAL	GDL	ION	MOZ
Aa00138	<b>0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0004</b>
Aa00681	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>

All'interno di tutte le località analizzate l'eterozigosità media osservata è risultata minore rispetto a quella attesa (Fig. 7). Il deficit di eterozigoti osservati, rispetto agli attesi, è in accordo con le numerose deviazioni dall'equilibrio di HW rilevate. Poiché le località sono risultate tutte fuori dall'equilibrio di HW per entrambi i loci analizzati, per confrontare tra loro i valori medi di eterozigosità sono stati utilizzati i dati relativi alle eterozigosità medie osservate (Archie, 1989).

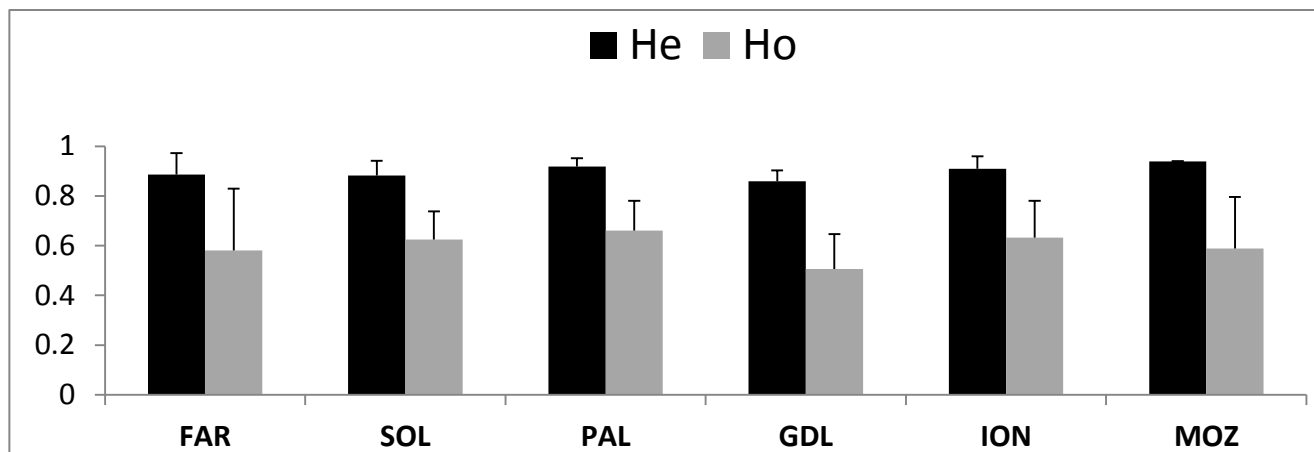


Fig. 7. Istogramma delle eterozigotità medie attese (He) ed osservate (Ho) nelle località considerate con relative deviazioni standard.

In seguito al *t*-test, effettuato per verificare la differenza tra valori medi di eterozigotità In seguito al osservata fra coppie di località, non è stata rilevata nessuna significatività; la variabilità genetica è quindi simile tra tutti i campioni, andando da Faro al Canale di Mozambico.

È stata osservata una ricchezza allelica media che identifica il Canale di Mozambico come maggiormente ricco (Fig. 8).

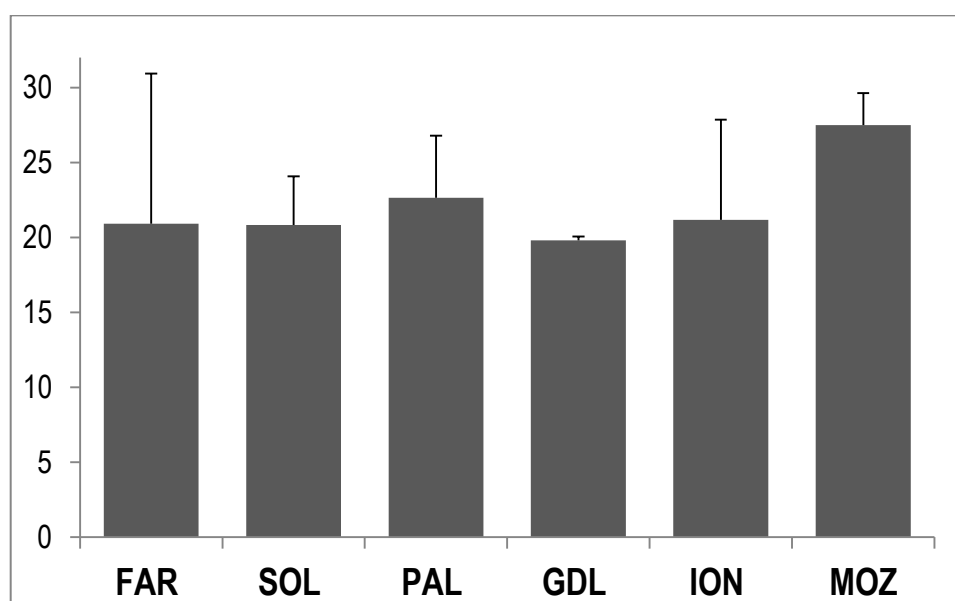


Fig. 8. Istogramma della ricchezza allelica media nelle località analizzate, ordinate da ovest verso est, con relative deviazioni standard. I valori sono stati ottenuti mediante procedura di rarefazione dei campioni (N=34).

### 3.1 Analisi della struttura genetica

I valori della F-statistica di Weir e Cockerham (1984) sono stati calcolati separatamente per entrambi i loci (Tab. 5).

**Tab. 5.** Valori della F-statistica di Weir e Cockerham (1984) per locus.

	$F_{ST}$		$F_{IS}$	
	media	dev. st.	media	dev. st.
Aa00138	0.007	0.005	0.228	0.118
Aa00681	0.004	0.006	0.413	0.221

I valori dell'indice di fissazione tra coppie di località sono risultati compresi fra  $F_{ST} = 0.007$  (Mar Ionio-Faro) e  $F_{ST} = 0.018$  (Canale di Mozambico-Golfo del Leone) (Tab. 6).

Le distanze nautiche minime fra località misurate in Km vanno da 120 Km (Palamos-Golfo del Leone) a 15520 Km (Mar Ionio-Canale di Mozambico)(Tab. 6).

**Tab. 6.** Distanze nautiche minime misurate in Km fra località (sopra la diagonale); i valori di  $F_{ST}$  calcolati per coppie di località (sotto la diagonale).

	<b>FAR</b>	<b>SOL</b>	<b>PAL</b>	<b>GDL</b>	<b>ION</b>	<b>MOZ</b>
<b>FAR</b>	0	1080	1330	1440	2680	12610
<b>SOL</b>	0.009	0	250	360	1800	13920
<b>PAL</b>	0.008	0.009	0	120	1690	14170
<b>GDL</b>	0.011	0.009	0.010	0	1620	14280
<b>ION</b>	0.007	0.009	0.006	0.012	0	15520
<b>MOZ</b>	0.016	0.015	0.009	0.018	0.013	0

Il flusso genico calcolato per coppie di località sulla base della F-statistica varia tra  $N_m = 13.436$  (Golfo del Leone-Canale di Mozambico) e  $N_m = 38.225$  (Soller-Canale di Mozambico). Il valore medio di flusso genico fra località è pari a  $N_m = 24.841$  (Tab. 7).

**Tab. 7.** Stime di flusso genico ( $Nm$ ) tra coppie di località basate su  $F_{ST}$  di Weir e Cockerham (1984).

	<b>FAR</b>	<b>SOL</b>	<b>PAL</b>	<b>GDL</b>	<b>ION</b>
<b>SOL</b>	27.496				
<b>PAL</b>	31.713	24.218			
<b>GDL</b>	26.638	34.224	19.879		
<b>ION</b>	22.130	28.371	15.233	27.875	
<b>MOZ</b>	28.457	38.225	16.341	13.436	18.377

Per quanto riguarda il test per la verifica della presenza di isolamento da distanza, la relazione tra  $F_{ST}$  e distanza geografica per coppie di località, valutata sul dataset totale e testata tramite test di Mantel, non è risultata significativa (Fig. 9).

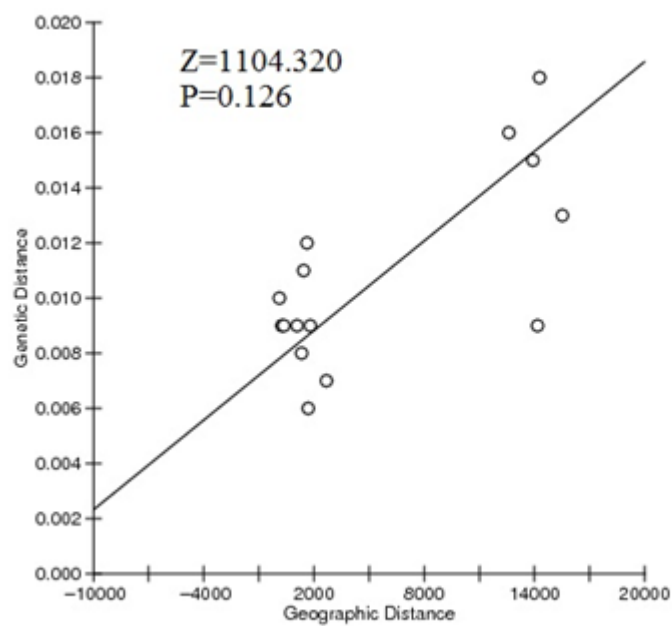


Fig. 9. Diagramma della relazione tra  $F_{ST}$  e distanze geografiche tra coppie di località. Z (coefficiente di Mantel) e P ottenuti mediante test di permutazione con 10000 repliche.

Sulla base dei valori della distanza genetica di Cavalli-Sforza e Edwards (1967) (Tab. 8) sono stati effettuati due ordinamenti spaziali mediante multidimensional scaling (MDS), uno con il dataset completo, l'altro escludendo il Canale di Mozambico dall'analisi. Il grafico MDS costruito sull'intero dataset mette in evidenza la netta separazione fra il Canale di Mozambico, unica località a più di 10000 chilometri di distanza, mentre quello costruito escludendolo dall'analisi non mette in evidenza un particolare pattern di distribuzione (Fig. 10).

**Tab. 8.** Distanza genetica di Cavalli-Sforza e Edwards (1967) (D) tra coppie di località

	FAR	SOL	PAL	GDL	ION	MOZ
FAR	0					
SOL	0.017	0				
PAL	0.017	0.018	0			
GDL	0.017	0.017	0.016	0		
ION	0.016	0.017	0.015	0.019	0	
MOZ	0.027	0.027	0.023	0.025	0.029	0

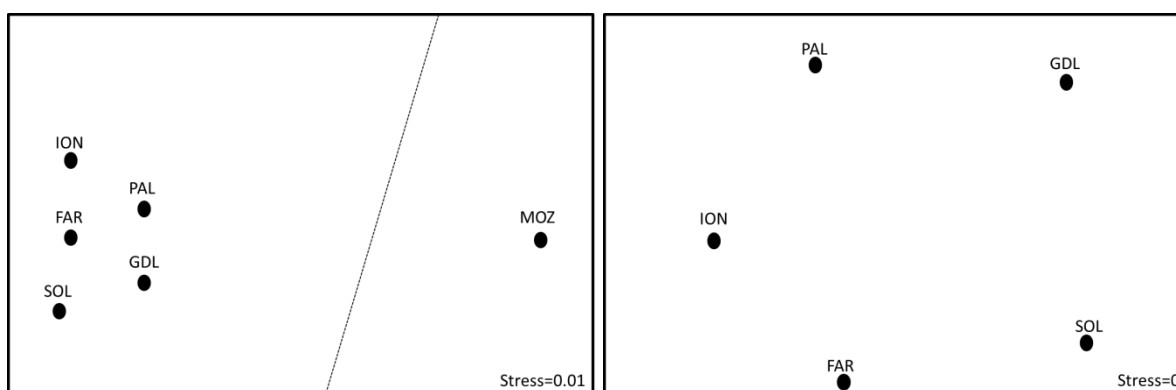


Fig. 10. Grafici MDS basati sui valori di distanza genetica di Cavalli-Sforza e Edwards (1967). A sinistra dataset completo; a destra, località del Canale di Mozambico esclusa.

In entrambe le analisi i valori dell'indice di stress sono molto bassi, ad indicare che la rappresentazione grafica rispecchia fedelmente le relazioni tra le località presenti nelle matrici di distanza genetica originarie.

L'analisi molecolare della varianza è stata eseguita considerando l'intero dataset su due livelli: varianza tra individui all'interno della località e varianza tra le località. Le differenze tra località spiegano lo 0.63% della varianza totale; il valore della R-statistica associato risulta non-significativo (Tab. 9).



**Tab. 9.** Risultati dell'analisi della varianza molecolare (AMOVA) a due fattori.

Sorgente di variazione	Gradi di libertà	Componenti di varianza	Percentuale di varianza spiegata	Statistica $R_{ST}$	P
Tra località	5	2.402	0.63	0.0063	0.38485
Entro località	518	387.367	99.38		

L'analisi di assegnazione Bayesiana ha permesso di rilevare due cluster genetici all'interno del dataset (Fig. 11). Gli individui della località del Canale di Mozambico risultano assegnati al cluster nero per un valore che supera il 50%. Gli individui delle località restanti sono tutti ripartiti in maniera piuttosto omogenea all'interno dei due cluster (Fig. 11).

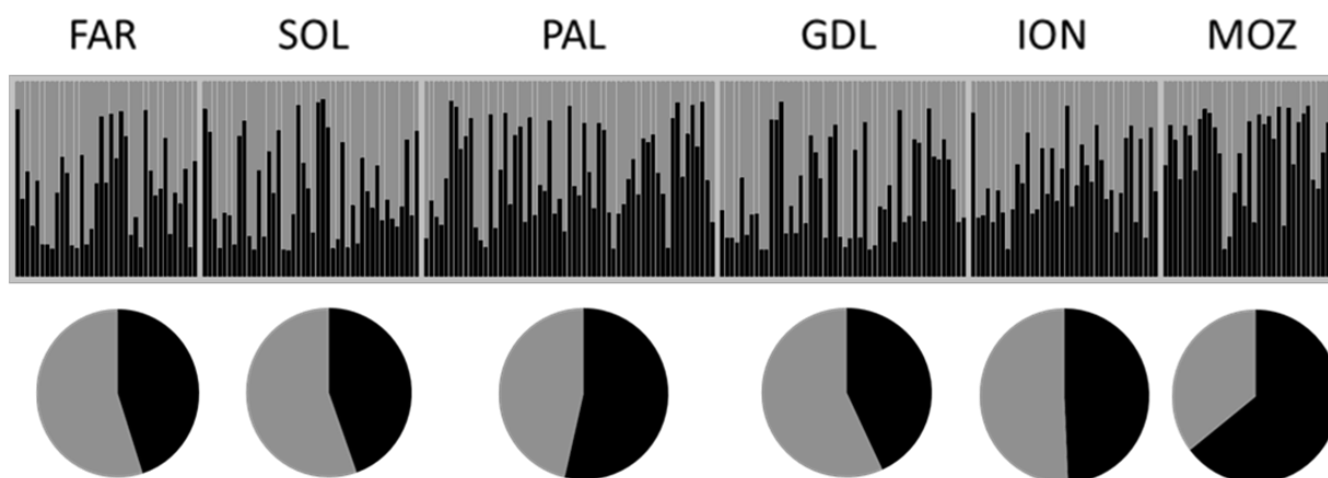


Fig. 11. Rappresentazione grafica dell'analisi assegnazione Bayesiana degli individui ai rispettivi cluster genetici. Ciascuna barra verticale rappresenta un individuo. Gli individui sono raggruppati per località di appartenenza. I grafici a torta rappresentano l'abbondanza relativa di ciascun cluster all'interno di ciascuna località.

I valori di probabilità associati ai diversi valori di K mostrano un andamento facilmente interpretabile, con valore modale pari a K=2. Le 5 repliche condotte in corrispondenza di ciascun valore di K hanno dato risultati fra loro discordanti (Fig. 12). I risultati di questa analisi devono essere considerati con molta cautela.

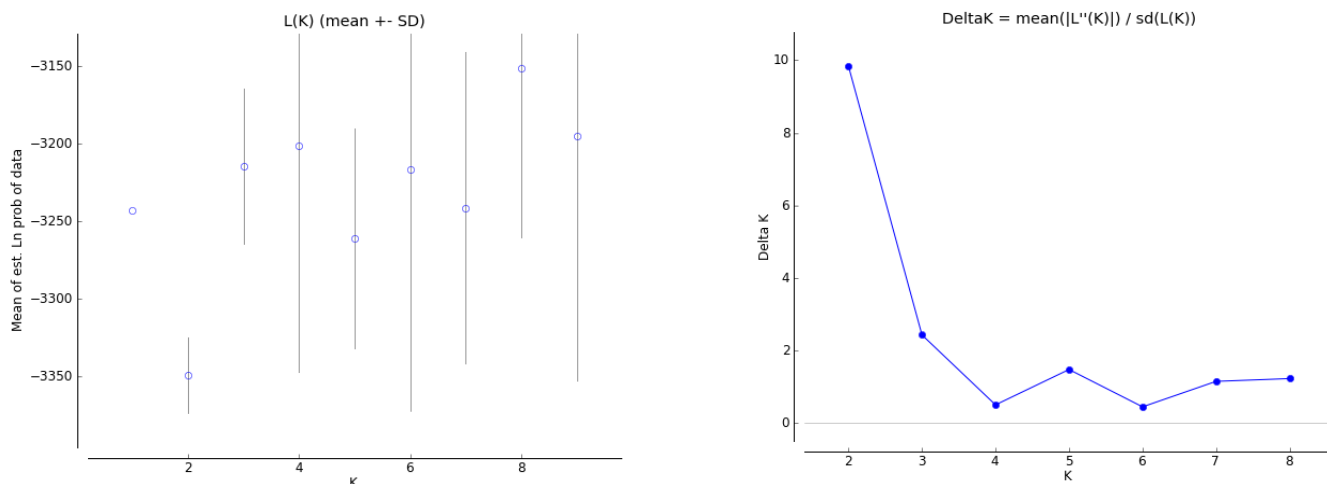


Fig. 12. Grafici relativi ai risultati della statistica Bayesiana. A sinistra, andamento della probabilità a posteriori all'aumentare di K. A destra, supporto statistico al variare di K, il valore modale di questa distribuzione rappresenta il valore di K (numero di cluster genetici) maggiormente supportato (Evanno *et al*, 2005).

L'albero filogenetico UPGMA (Fig. 13), costruito utilizzando 1000 repliche bootstrap delle matrici di distanza genetica di Cavalli-Sforza e Edwards (1967), mostra affinità tra le località ben supportate da valori bootstrap medio-alti a livello dei nodi .

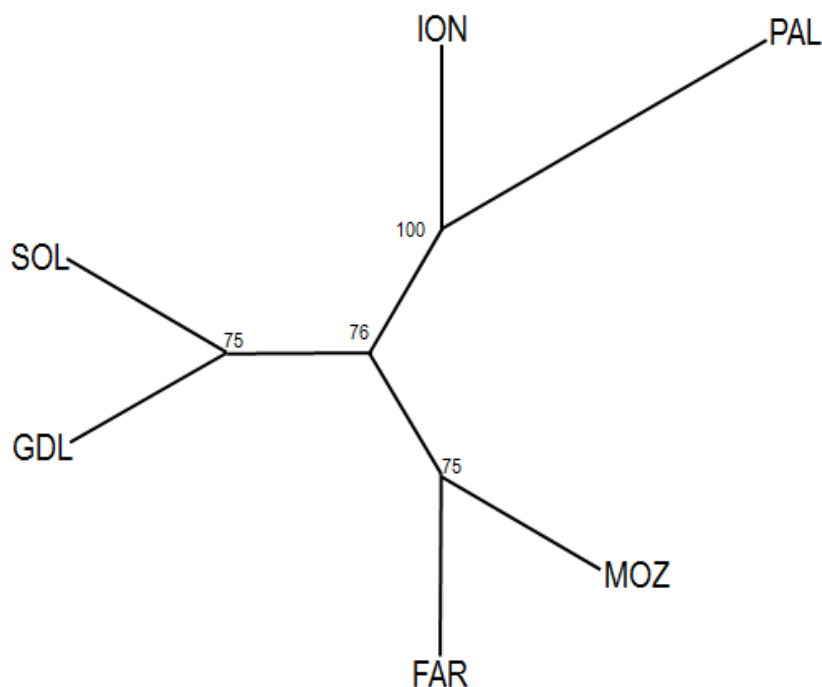


Fig. 13 :Albero filogenetico UPGMA

#### 4. Discussione

I due loci microsatellitari utilizzati in questo studio hanno dimostrato di essere marcatori molecolari efficaci per stimare la diversità genetica di *A. antennatus*; infatti, il numero di alleli rilevati in corrispondenza di ciascun locus è risultato molto elevato e ha consentito di evidenziare numerosi polimorfismi. L'efficacia di questi due loci è stata assai minore, però, nel rilevare la struttura genetica della specie nell'area di studio. I test effettuati per la valutazione della presenza di linkage disequilibrium sui due loci hanno restituito risultati negativi, quindi i loci sono stati trattati come indipendenti tra loro.

Tutte le località analizzate sono risultate fuori dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HW) per entrambi i loci considerati. Il generale discostamento rispetto alle attese di HW rilevato nelle località considerate, dovuto ad un generale deficit di individui eterozigoti, si osserva anche nei valori di eterozigosità media attesa, che sono sostanzialmente (maggiori) rispetto a quelli di eterozigosità media osservata, (minori) all'interno di ciascuna località. Risultati simili sono stati riscontrati anche da Cannas *et al* (2011) in uno studio effettuato con otto loci microsatellitari in campioni di *A. antennatus* raccolti in nove località del Mediterraneo occidentale. È da rilevare comunque che un generale deficit di individui eterozigoti è stato osservato e considerato abbastanza comune, in altre specie di gamberi peneidi, una famiglia filogeneticamente molto vicina agli aristeidi, quali ad esempio *Penaeus monodon* (Li *et al*, 2007), *Farfantepenaeus notialis* (Robainas-Barcia *et al*, 2008) e *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* (Meng *et al*, 2009).

Il deficit di individui eterozigoti riscontrato nel presente lavoro potrebbe essere conseguente a fattori tecnici o di tipo biologico. I fattori tecnici potrebbero coinvolgere la presenza di alleli nulli all'interno dei dataset, ovvero di alleli che per diversi motivi non sono stati amplificati con successo nel corso di amplificazione ed il cui segnale è andato perso, che possono causare deviazioni dalle proporzioni di HW, in particolare un deficit di individui eterozigoti, oppure essere dato da un errore nel campionamento, ovvero la possibilità che il numero di individui campionati sia insufficiente per individuare tutti i possibili genotipi. I fattori biologici che solitamente vengono messi in gioco per spiegare il generale deficit di eterozigoti sono 1) la selezione naturale contro gli eterozigoti, 2) l'effetto Wahlund e 3) l'inbreeding. Tendiamo ad escludere la selezione naturale, dato che i microsatelliti sono considerati marcatori molecolari neutrali. Anche l'effetto Wahlund sembra una spiegazione poco plausibile, data la presenza di

strutturazione genetica molto lieve in questa specie. Stesso vale per l'inbreeding, che non ci aspettiamo spieghi il deficit nella nostra specie, per la biologia della stessa e riscontrando elevati livelli di divergenza genetica. Nel campione del Canale di Mozambico sono stati rilevati livelli di variabilità superiori rispetto agli altri campioni. Ciò è particolarmente evidente se si considera la ricchezza allelica media, parametro che è basato su una procedura di rarefazione e che quindi non conta della differenza tra le dimensioni dei campioni. Questo risultato corrobora quanto rilevato da Fernandez *et al* (2011), in uno studio su *A. antennatus* che impiegava sequenze di DNA mitocondriale (COI e 16S). Questi Autori infatti riportano stime di diversità genetica ( $h$ , diversità aplotipica) maggiori in Oceano Indiano ( $h= 0.989$ ) rispetto a quelle rilevate nelle altre località ( $0.433 < h < 0.941$ ).

Il valore dell'indice di fissazione calcolato sui due loci analizzati nel presente lavoro ( $F_{ST}= 0.006$ ) è risultato non-significativamente diverso da zero, ad indicare una generale omogeneità genetica tra campioni, cioè assenza di strutturazione genetica nell'area di studio. Analogamente i valori di  $F_{ST}$  calcolati tra coppie di località non sono risultati significativi, confermando una sostanziale omogeneità genetica per i due loci microsatellitari considerati nell'area di studio. Esprimendo questo dato sotto forma di stime di flusso genico (numero di migranti efficaci per generazione,  $Nm$ ), si osserva infatti come fra queste coppie di località lo scambio di migranti sia molto elevato. Il flusso genico medio stimato tramite la  $F$ -statistica ( $Nm=24.841$ ), indicherebbe ampia connettività tra le varie località.

È da rilevare comunque che questa inattesa assenza di strutturazione genetica sulla scala spaziale di circa 10000 km potrebbe essere spiegata sulla base delle caratteristiche dei marcatori molecolari utilizzati. Il tasso di mutazione estremamente elevato delle regioni di DNA considerate, che determina elevati livelli di polimorfismo osservati, può portare ad una sottostima della divergenza genetica (Balloux *et al*, 2000). Questi Autori raccomandano di usare molta cautela nell'interpretare i risultati sulla divergenza genetica ed anche sulle stime di flusso genico ottenute con marcatori ipervariabili come i due loci microsatellitari impiegati nel presente lavoro. Da questo punto di vista hanno funzionato meglio i marcatori mitocondriali COI e 16S nello studio di Fernandez *et al* (2011) dove a seguito dell'elevata presenza di aplotipi riscontrati viene individuata una significativa divergenza genetica tra popolazioni, unico punto in comune con il nostro studio è l'identificazione del Mediterraneo occidentale come località geneticamente omogenea.

Si deve mettere in evidenza inoltre che *A. antennatus* ha caratteristiche biologiche che favoriscono la dispersione e quindi l'omogeneità. Le modalità di riproduzione degli invertebrati marini bentonici sono cruciali nel determinare il potenziale per la dispersione

della maggior parte delle specie e, di conseguenza, per i livelli di strutturazione genetica e di flusso genico tra popolazioni o sottopopolazioni. Pertanto, il grado di divergenza genetica tra popolazioni di specie con larve planctotrofiche a lunga vita pelagica risulta tipicamente basso, questo è dovuto al fatto che il flusso genico può avvenire anche a distanze considerevoli. È da notare comunque come studi più o meno recenti abbiano trovato eccezioni, evidenziando casi in cui larve a lunga vita pelagica non determinano ampia dispersione. Tra questi studi è da menzionare quello riguardante il crostaceo decapode *Homarus americanus* (Tracey *et al*, 1975). I dati sull'ecologia larvale di *A. antennatus* sono ad oggi piuttosto scarsi, si ritiene comunque che le forme larvali planctotrofiche siano in grado, trasportate dalle correnti, di realizzare dispersione ad ampio raggio. Per quanto concerne il movimento delle forme adulte, vari modelli di pesca suggeriscono che questa specie di gambero sia capace di spostamenti sia in verticale che in orizzontale: ciò è suggerito dal fatto che il rendimento di pesca cambia con periodicità giornaliera, con massimi in condizioni di luce e minimi di notte, indicando una vita bento-pelagica (Relini, 1981; Bianchini *et al*, 1998). Inoltre, da un anno all'altro, si è occasionalmente registrata un'oscillazione imputabile alla comparsa di forti correnti associate ad eventi di discesa di acqua fredda lungo i fondali (cascading), fino a raggiungere le zone in cui *A. antennatus* è solito vivere (Company *et al*, 2008). Ciò comporterebbe una migrazione “forzata” verso il basso di interi stock dalle aree di pesca, ma sembrerebbe anche indurre il successivo reclutamento di esemplari giovani e quindi il ripristino degli stock superficiali (Company *et al*, 2008). Tecniche di marcatura (“tagging”), rilascio e ricattura applicate a stock di peneidi costieri in Australia hanno rivelato migrazioni inaspettate che talvolta superano i 1000 km o più (Dall *et al*, 1990). Relini *et al* (2000) hanno applicato tecniche analoghe a *A. antennatus*, per ottenere informazioni dirette sui movimenti e la crescita. Questi Autori hanno riportato la ricattura dopo un mese dalla marcatura di un individuo a circa dieci miglia nautiche dal punto di rilascio, a conferma della capacità degli individui adulti di compiere spostamenti orizzontali di entità non trascurabile. Da queste osservazioni si può proporre che in *A. antennatus* esista un contributo al flusso genico tra località relativamente distanti anche a carico degli individui adulti.

Le rappresentazioni grafiche ricavate con il multidimensional scaling (MDS) e l'analisi di regressione per saggiare l'isolamento da distanza (IBD) ci mostrano una separazione abbastanza netta del campione proveniente dal Canale di Mozambico rispetto agli altri. Per quanto riguarda l'IBD il valore di probabilità associato al test statistico non risulta statisticamente significativo, è da notare, però, che l'isolamento da distanza, se presente, può non essere rilevato, in quanto dovrebbe essere adottata la “distanza geografica effettiva” cioè

la distanza che tiene conto delle correnti superficiali, delle barriere al flusso genico non apparenti, del comportamento larvale, ecc. (Maltagliati *et al*, 2010). I risultati ottenuti a seguito dell'analisi della varianza molecolare (AMOVA) hanno evidenziato come la maggior parte della varianza sia attribuita alla componente “entro località”, (99%). Ci potremmo trovare anche qui in una situazione in cui sono presenti fattori tecnici e biologici che spiegano quanto osservato: potrebbe esserci un limite tecnico derivato dal fatto che i due loci utilizzati che non sono in grado di cogliere la strutturazione o indicare come effettivamente *A. antennatus* sia geneticamente strutturato in un'unica popolazione; quest'ultimo risultato è in accordo con quanto rilevato in studi con il DNA mitocondriale; infatti Maggio *et al* (2009) e Roldan *et al* (2009) hanno rilevato valori rispettivamente di 98 e 97%. In un precedente lavoro morfologico-genetico su *A. antennatus*, con un disegno di campionamento che considerava la quasi totalità del Mediterraneo e parte dell'Atlantico, con la tecnica degli alloenzimi, sono stati ottenuti valori di eterozigosità compresi tra  $H = 0.043$  e  $H = 0.066$  ed un grado di divergenza genetica tra campioni locali molto basso ( $F_{ST} = 0.017$ ,  $D_{max} = 0.002$ ) (Sardà *et al* 1998). Gli Autori osservano anche in questo la mancanza di strutturazione genica nella specie e l'assenza di una suddivisione geografica, rilevabile invece con le analisi morfologiche. Inoltre recentemente sono stati rilevati alti livelli di omogeneità genetica tra campioni raccolti lungo un gradiente batimetrico nel Mar Catalano (Sardà *et al*, 2010). Il risultato ottenuto non sorprende, poichè la differenziazione genetica risulta progressivamente meno apprezzabile nelle specie di gamberi che hanno un'elevata probabilità di scambiare individui tra popolazioni diverse (Mulley e Latter, 1980). Difatti, seguendo la classificazione del ciclo vitale proposta da Dall *et al* (1990) per i peneidi, *A. antennatus* è caratterizzato da un ciclo vitale di “tipo 4”, cioè tipico di specie che passano tutta la loro vita in regioni lontane dalla costa, con grosse opportunità di mescolamento. Situazione di scarsa diversità genetica tra campioni geograficamente distanti possono ritenersi comuni negli invertebrati marini ad ampia dispersione, a conferma di ciò nella specie in esame è stato visto che, in alcuni casi, individui campionati nella medesima località presentano tra loro una maggiore diversificazione genetica che non rispetto ad altri prelevati a centinaia di chilometri (Sardà *et al*, 2003). Divergenza genetica tra regioni è stata registrata per la prima volta in *A. antennatus* da Fernandez *et al* (2011), tramite l'utilizzo di marcatori molecolari mitocondriali (COI e 16sRNA). Questi Autori hanno identificato quattro “stock genetici” presenti in altrettante regioni distinte, (Oceano Atlantico, Mediterraneo occidentale, Mediterraneo orientale e Oceano Indiano), la diversità genetica tra stock sarebbe dovuta alla presenza di barriere idrografiche e/o costrizioni biogeografiche che limitano il flusso genico. Il nostro

lavoro è in accordo con lavori precedenti, in cui, sia con l'utilizzo di marcatori alloenzimatici (Sardà *et al*, 1998), che con quello di marcatori mitocondriali (Maggio *et al*, 2009; Roldan *et al*, 2009) non è stata osservata strutturazione genetica a livello dell'Atlantico e del Mediterraneo. Non può infatti essere escluso che possa avvenire un flusso genico tra queste regioni. La dispersione larvale dipende dalle correnti superficiali (Modified Atlantic Water, da 0 a 200 m di profondità), che all'interno del Mediterraneo occidentale sono dominate principalmente dalla corrente settentrionale dalla Liguria verso acque Provenzali e canale di Ibiza, e secondariamente dalla corrente algerina da Oran lungo la costa Africana (Millot, 1999). Il Mediterraneo orientale potrebbe ricevere larve dall' Oceano Atlantico e Mediterraneo occidentale che sono portate via dalla corrente Algerina. Uova e larve alla deriva di *A. antennatus* sarebbero presenti dall'estate all'autunno, in più la dispersione degli adulti e una migrazione orizzontale a lunga distanza potrebbe giocare un ruolo importante nel determinare l'omogeneità genetica trovata all'interno del Mediterraneo occidentale (Relini *et al*, 2000) favorita dall' influenza della circolazione antioraria delle acque intermedie (200-2000 m) e profonde (> 2000 m) all'interno della regione (Millot, 1999). In modo simile, l'Oceano Atlantico riceverebbe migranti adulti del Mediterraneo occidentale. Il fronte di Almeria-Oran, formato dalla confluenza delle acque superficiali entranti nel Mediterraneo e dalle uscenti dallo stesso, più dense, creerebbe una potenziale barriera nei 200 m più superficiali della colonna d'acqua; comunque il mare è profondo più di 1000 m in questo punto (Allen *et al*, 2008), non si attuerebbe quindi nessuna restrizione al flusso genico, dato che gli adulti da entrambi i lati del fronte, i cui picchi di abbondanza sono situati tra 600 e 900 m di profondità, potrebbero interagire al di sotto di esso (Sardà *et al*, 2004). L'analisi dell' assegnazione Bayesiana degli individui ha evidenziato la presenza di un unico cluster, un risultato opposto è stato ottenuto sempre da Fernandez *et al* (2011), dove si riscontravano due aplogruppi nella medesima area di studio, utilizzando più siti di campionamento all'interno del Mediterraneo. Risulta difficile persino formulare ipotesi attendibili sull'origine di questi due cluster genetici. La ripartizione degli individui non identifica una tendenza particolare alla prevalenza di un cluster sull'altro, ad eccezione del Canale di Mozambico. Questa propensione potrebbe aggiungersi a quelle osservate per la ricchezza allelica e per la rappresentazione MDS in cui questa località sembra discostarsi leggermente dalle altre. Ciò potrebbe essere collegato al fatto che l'attività di pesca in questa zona è iniziata dopo rispetto alle altre (primi anni 2000 vs 1930), permettendo alla specie di mantenere più elevata una diversità che comunque potrebbe essere correlata alla particolare posizione geografica.

Per ciò che concerne l'identificazione di stock genetici, il presente lavoro non ha condotto alla rilevazione di alcuno di essi, gli invertebrati marini costituiscono una componente importante dei pescherecci commerciali e i livelli di differenziazione genetica tra popolazioni sono bassi (Ward *et al*, 1994). Distinguere il segnale dal rumore può essere difficile (Waples, 1998). Se la differenziazione è presente, ci si aspetta risulti essere bassa e la taglia del campione è spesso troppo piccola per individuare questi bassi livelli. Campioni dalle dimensioni ridotte provenienti da due regioni potrebbero risultare statisticamente omogenei, ma il potere di un piccolo campione di rivelare bassi livelli di diversità è molto limitato. La scoperta di divergenze genetiche non riscontrabili tra campioni sono un luogo comune, ma di poco valore per i gestori della risorsa (Ward *et al*, 2000).

Dai risultati ottenuti in questo lavoro possiamo dedurre che *A. antennatus* presenta un'elevata diversità genetica, ripartita abbastanza uniformemente all'interno della sua zona di distribuzione. L'alto livello di diversità genetica in questa specie aiuterebbe a preservarla dagli effetti genetici dannosi dell'aumento della pressione della pesca. In teoria, una taglia elevata della popolazione e un'alta fecondità tendono a rendere *A. antennatus* poco suscettibile ad un collasso delle popolazioni. Comunque, un tasso abbondante di sfruttamento (maggiore del presente) potrebbe aggravare l'ampiezza delle fluttuazioni naturali delle popolazioni e inoltre ridurre col tempo la taglia effettiva della popolazione, con conseguenze genetiche dannose.

Il monitoraggio genetico potrebbe aiutare ad identificare tempestivamente effetti negativi sulla diversità genetica causata dalla pesca e pianificare misure di gestione e conservazione degli stock.

.



## 5.CONCLUSIONI

Le analisi condotte sulla struttura genetica di *Aristeus antennatus*, utilizzando due marcatori microsatellitari, consentono di concludere che:

1. Vi è stato un aumento della conoscenza genetica della specie grazie all'impiego di marcatori molecolari nuovi per la specie.
2. *A. antennatus* presenta alti livelli di variabilità genetica distribuita in maniera omogenea all'interno del suo range di distribuzione.
3. Non è stata rilevata strutturazione genetica all'interno del range di distribuzione della specie.
4. L'alto livello di variabilità genetica in questa specie può essere una caratteristica contro la vulnerabilità che deriva dagli effetti negativi legati alla pressione della pesca.
5. Con i due loci microsatelliti impiegati non è stato possibile definire differenti stock utili alla gestione della risorsa.
6. A seguito dei risultati conseguiti da Fernandez *et al* (2011), l' mtDNA sembrerebbe essere un marcatore molecolare migliore dei microsatelliti per l'individuazione degli stock in *A. antennatus*.

## 6. Bibliografia

- Allen JT, Painter SC, Rixen M (2008) Eddy transport of Western Mediterranean Intermediate Water to the Alboran Sea. *J Geophys Res*, 113:C04024
- Allendorf FW, Ryman N e Utter FM (1987) Genetics and fishery management. Past, present and future. In: Ryman N, Utter F (Eds.) *Population genetics and fishery management*. University of Washington, USA
- Archie JW (1985) Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. *Evolution*, 39: 623-637
- Ball AD, Stapley J, Dawson DA, Birkhead, TR., Burke T, and Slate J (2010) A comparison of SNPs and microsatellites as linkage mapping markers: lessons from the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *BMC. Genomics*, 11: 218
- Balloux F, Brüner H, Lugon-Moulin N, Hausser J, Goudet J (2000) Microsatellites can be misleading: an empirical and simulation study. *Evolution*, 54: 1414-1422
- Barker GC (2002) Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 96(1) :21-24
- Beckman JS, Weber JL (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12(4): 627–631
- Begg GA, Waldman JR (1999) An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries Research* 43: 35–44
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2000) Genetix, A Windows™ Based Software for Population Genetic Analyses. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France
- Bensch A, Gianni M, Gréboval D, Sanders JS, Hjort A (2008) Worldwide review of bottom fisheries in the high seas. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 522. Rome
- Bianchini MI, Di Stefano L, Ragonese S (1998) Daylight vs night variations in the redshrimps catches of the Strait of Sicily. *Rapports Commission Internationale pour la Mer Méditerranée*, 35: 374-375

- Bianchini MI, Ragonese S, (1994) Life cycles and fisheries of the deep-water red shrimps *Aristeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus*. *NTR-ITPP Special Publication*, 3, Mazara, Italy, 87
- Campillo A (2004) Bio-ecology of *Aristeus antennatus* in the French Mediterranean. In: Bianchini ML, Ragonese (Eds.) Life cycles and fisheries of the deep-water red shrimps *Aristaeomorpha foliacea* e *Aristeus antennatus*. Proceedings of the International Workshop held in the Istituto di Tecnologia della Pesca e del Pescato (NTR ITPP), Mazara del Vallo, Italy ITTP Special Publication, 3: 25-26
- Cannas R, Buccoli S, Sacco F, Marcias S, Salvadori S, Cau A, Deiana A (2008) Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite markers for the blue and red shrimp, *Aristeus antennatus* (Crustacea, Decapoda). *Mol Ecol Resour*, 8: 1420-1422
- Cannas R, Sacco F, Follesa MC, Sabatini A, Arculeo M, Lo Brutto S, Deiana AM, Cau A (2011) Genetic variability of the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* in the Western Mediterranean Sea inferred by DNA microsatellite loci. *Mar Ecol* doi:10.1111/j.1439-0485.2011.00504.x
- Carbonell A, Dos Santos A, Alemany F, Velez-Belchi P (2010) Larvae of the red shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata: Aristeidae) in the Balearic Sea: new occurrences fifty years later. *Mar. Biodiv. Rec.* 3: e103
- Cartes JE, Demestre M (2003) Estimating secondary production in deep water shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the Catalano-Balearic Basin (Western Mediterranean). *J Northw Atl Fish Sci*, 31: 355-361
- Cartes JE, Sardà F (1989) Feeding ecology of the deep-water aristeid crustacean *Aristeus antennatus*. *Mar Ecol-Prog Ser*, 54: 229-238
- Cartes JE, Sardà F, Company JB, Lleó J (1993) Day-night migrations by deep-sea decapod crustaceans in experimental samplings in the Western Mediterranean sea. *J Exp Mar Biol Ecol*, 171: 63-73
- Carvalho AR, Hauser L (1994) Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev Fish Biol Fish*, 4: 326-350
- Cau A, Carbonell A, Follesa MC, Mannini A, Norrito G, Orsi-Relini L, Politou CY, Ragonese S, Rinelli P (2002) MEDITS – Based information on the deep-water red shrimps *Aristomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda: Aristeidae). *Scientia Marina*, 66 (2): 103-124

- Chambers GK, MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.*, 126: 455-476
- Chartosia N, Tzomos TH, Kitsos MS, Karani I, Tselepides A, Kokouras A (2005) Diet comparison of the bathyal shrimps, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) and *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) (Decapoda, Aristidae) in the eastern Mediterranean. *Crustaceana* 78: 273-280 on Deep Sea Populations. *PlosOne*, 1: 1-8
- Clarke KR, Warwick RM (2001) Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2<sup>nd</sup> edition. PRIMER-E, Plymouth.
- Cognetti G, Maltagliati F (2004) Strategies of genetic biodiversity conservation in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 811-812
- Company JB, Puig P, Sardà F, Palanques A, Latasa M, Scharke R (2008) Climate influence on Deep Sea Populations. *PlosOne*, 1: 1-8
- Dall W (2001) Australian species of Aristeidae and *Benthescy midae* (Penaeoidea: Decapoda). *Memoirs of the Queensland Museum, Brisbane, Australia*, 46: 409-441
- Dall W, Hill BJ, Rothlisberg PC, Sharples DJ (1990) The biology of the Penaeidae. *Advances in Marine Biology*, Academic Press, New York: 1-489
- de Grave S, Fransen CHJM (2011) Carideorum catalogus: the recent species of the dendrobranchiate, stenopodidean, procarididean and caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). *Zool. Med. Leiden*, 85(9): 195-589
- Demestre M, Leonart J (1993) The population dynamics of *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata) in the Northwestern Mediterranean. *Scientia Marina*, 57 (2-3):183-189
- Demestre M, Martin P (1993) Optimum exploitation of the demersal resource in the western Mediterranean: in the fishery of the deep-water shrimps *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Scientia Marina*, 57 (2-3): 175-182
- Desantis S, Labate M, Tursi A, D'onghia G, Maiorano P (1988) Testicular activity in the shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Sci Mar*, 57: 175-182
- DeWoody JA, Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461-473
- Dos Santos A (1998) On the occurrence of larvae of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea) off the Portuguese coast. *J. Nat. Hist.*, 32: 1519-1523

- Earl DA, vanHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resources*, 4: 359-361
- Edwards A, Civitello A, Hammond H, Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49: 746-56
- Efron B (1979) Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Annals of Statistics*, 7: 1-26., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8): 2611-2620
- Everhart HW, Youngs WD (1981) *Principles of fishery science* 2<sup>nd</sup> ed. Cornell University Press. Ithaca, New York
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491
- Excoffier L., Lischer HEL (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programsto perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564–567
- Food and Agriculture Organisation <http://www.fao.org/fishery/species/3422/en>
- FCP (2007) Fishery country profile- Mozambique [ftp://ftp.fao.org/FI/DOCUMENT/fcp/EN/FI\\_CP\\_MZ.pdf](ftp://ftp.fao.org/FI/DOCUMENT/fcp/EN/FI_CP_MZ.pdf)
- Fernandez MV, Heras S, Maltagliati F, Turco A, Roldán MI (2011) Genetic structure in the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* and the role played by hydrographical barriers. *Mar Ecol Prog Ser*, Vol. 421: 163-171
- Fernández MV, Heras S, Viñas J, Maltagliati F, Roldán MI (2013) Multilocus comparative phylogeography of two aristeid shrimps of high commercial interest (*Aristeus antennatus* and *Aristaeomorpha foliacea*) reveals different responses to past environmental changes. *PlosOne* Vol. 8, Issue 3

- Figueredo MJ, Figueredo I, Machado PB (2001) Deep-water penais shrimp (Crustacea:Decapoda) from off the portuguese continental slope: an alternative future resource? Fish Res, 51:321-326
- Freitas AJ (1985) The penaeoidea of southeast Africa. II. The families Aristeidae and Solenoceridae. Invest. Rep. Oceanogr. Res. Inst., 57: 1–69
- Gemayel R, Vincens MD, Legendre M, Verstrepen KJ (2010) Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. Annu. Rev. Genet, 44: 445-477
- Goldstein DB and Clark AG (1995) Microsatellite variation in north American populations of *Drosophila melanogaster*. Nucleic Acids Research, 23: 3882-6
- Goldstein DB, Schlotterer C (Eds) (1999) Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press: Oxford.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Lausanne: University of Lausanne
- Graves JE (1998) Molecular insight into the population structures of cosmopolitan marine fishes. J Hered, 89: 427-437
- Gray JS, (1997) Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. Biodiversity and Conservation, 6: 153-175
- Grover A, Sharma PC (2011) Is spatial occurrence of microsatellites in the genome a determinant of their function and dynamics contributing to genome evolution? Current Science 100[6]
- Hardy GH, 1908. Mendelian proportions in a mixed population. Science, 28 (706): 49-50
- Heldt JH (1954) Stades larvaires d'*Aristeomorpha foliacea* (Risso) et *Aristeus antennatus* (Risso). Décapodes Penéides. Compt. Rend. Acad. Sci, 239: 1080-1082
- Heldt JH (1955) Contribution à l'étude de la biologie des crevettes pénéides *Aristaeomorpha foliacea* (Risso) et *Aristeus antennatus* (Risso) (Formes larvaires). BSSNT, 8: 1-29
- Hickman CP Jr, Roberts LS, Larson A, (2003) Diversità animale. McGraw-Hill, Milano, 403
- Holsinger KE e Weir BS (2009) Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting  $F_{ST}$ . Nature Reviews Genetics, 10: 639-650

- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11: 424-429
- Kapiris K, Thessalou-Legaki M (2009) Comparative reproduction aspects of the deep-water shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus* (Decapoda, Aristeidae) in the Greek Ionian Sea (Eastern Mediterranean). *Int J Zool* 9
- Katti MV, Ranjekar PK, Gupta VS (2001) Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 18: 1161-1167
- Lessa EP (1990) Multidimensional-analysis of geographic genetic-structure. *Systematic Zoology*, 39: 242-252
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin, R (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25: 2078-2079
- Li Y, Wongprasert K, Shekhar M, Ryan J, Dierens L, Meadows J, Preston N, Coman G, Lyons RE (2007) Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. *Aquaculture*, 266: 279–288
- Lleonart J, Maynou F (2003) Fish stock assessment in the Mediterranean, state of the art. *Sci Mar*, 67 (S1): 37-49
- MacLean JA, Evans DO (1981) The stock concept, discreteness of fish stocks, and fisheries management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38: 1889-1898
- Maggio T, Lo Brutto S, Cannas R, Deiana AM (2009) Environmental features of deep-sea habitats linked to the genetic population structure of a crustacean species in the Mediterranean Sea. *Mar Ecol*, 30: 354-365
- Maltagliati F, Di Giuseppe G, Barbieri M, Castelli A, Dini F (2010) Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Biological Journal of Linnean Society*, 100: 910-923
- Martínez-Baños P, Mas J (1994) Life cycle of *Aristeus antennatus* in Southeastern Spain. In: Bianchini ML and Ragonese (eds), *Life cycles and fisheries of the deep-water red shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus**. NTR-ITPP Special Publication, 3: 9-10

- Meng XH, Wang QY, Jang IK, Liu P, Kong J (2009) Genetic differentiation in seven geographic populations of the fleshy shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* based on microsatellite DNA. *Aquaculture*, 287: 46–51
- Millot C (1999) Circulation in the Western Mediterranean Sea. *J Mar Syst*, 20: 423-442
- Morin PA, Mahboubi P, Wedel S, Rogers J (1998) Rapid screening and comparison of human microsatellite markers in baboons: allele size is conserved, but allele number is not. *Genomics*, 53:12–20
- Mulley JC, Latter BDH (1980) Genetic Variation and Evolutionary Relationships Within a Group of Thirteen Species of Penaeid Prawns. *Evolution*, 34: 904-916
- NRC (1996) The evaluation of forensic DNA evidence. National Research Council, National Academy Press, Washington DC
- Palsboll J, Berubè M, Allendorf FW (2006) Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22:11–16
- Primmer CR, Ellegren H, Sheldon BC (1996) Microsatellite ‘evolution’: directionality or bias. *Nat. Genet.*, 11: 360–362
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959
- Procaccini G, Maltagliati F (2003) Approcci metodologici all’analisi della diversità genetica di organismi bentonici. In: *Manuale di metodologie di campionamento e studio del bentos marino mediterraneo*. Gambi MC & Dappiano M (eds.). *Biologia Marina Mediterranea (suppl.)*, 10: 509-548
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249
- Reiss H, Hoarau G, Dickey-Collas M, Wolf WJ (2009) Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. *Fish Fish*, 10: 361-395
- Relini G (1981) Campagna di pesca a strascico 1977 sui fondi batiali del Mar Ligure nell’ambito di programmi finalizzati. *Quaderni del Laboratorio di Tecnologia della Pesca*, 31 (1): 111-122
- Relini M, Maiorano P, D’Onghia G, Relini LO, Tursi A, Panza M (2000) A pilot experiment of tagging the deep shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Scientia Marina*, 64: 357–361



- Robainas-Barcia A, Blanco G, Sanchez J, Monnerot M., Solignac M., Garcia-Machado E (2008) Spatio-temporal genetic differentiation of Cuban natural populations of the pinkshrimp *Farfantepenaeus notialis*. *Genetica*, 133: 283–294
- Roldán MI, Heras S, Patellani R, Maltagliati F (2008) Analysis of genetic structure of the red shrimp *Aristeus antennatus* from the Western Mediterranean employing two mitochondrial regions. *Genetica*, 136: 1-4
- Rubinsztein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Jain S, Li SH, Margolis RL, Ross CA, Ferguson-Smith MA (1995) Microsatellite evolution — evidence for directionality and variation in rate between species. *Nature Genetics*, 10: 337-343
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sardà F, Cartes JE (1997) Morphological features and ecological aspects of early juvenile specimens of the Aristeid shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816). *Mar Freshwater Res* 48:73-7
- Sardà F, Calafat A, Flexas MM, Tselepides A, Canals M, Espino M, Tursi A (2004) An Introduction to Mediterranean deep-sea biology. *Sci Mar*, 68:7-38
- Sardà F, Cartes JE (1993) Relationship between size and depth in decapod crustacean populations in the deep slope in the Western Mediterranean. *Deep-Sea Res I*, 40: 2389-2400
- Sardà F, Cartes JE, Norbis W (1994) Spatio-temporal structure of the deep-water shrimp *A. antennatus* (Risso, 1816) (Decapoda: Aristeidae) population in the Western Mediterranean. *NOAA Fishery Bulletin*,. 92 (3): 599-607
- Sardà F, Company JB, Castellón A (2003) Intraspecific aggregation structure of a shoal of western Mediterranean (Catalan Coast) deep-sea shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) during the reproductive period. *J Shellfish Res*, 22: 569-579
- Sardà F, Company JB, Maynou F (2002) Deep-sea shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the Catalan Sea, a review and perspectives. *J Northw Atl Fish Sci* 31: 1-10
- Sardà F, Company JB, Maynou F (2003) Deep-sea Shrimp *Aristeus antennatus* (Risso 1816) in the Catalan Sea, a Review and Perspectives. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Scienc*, Vol. 31: 1-10

- Sardà F, D'Onghia G, Politou CY, Company JB, Maiorano P, Kaporis K (2004) Deep-sea Distribution, biological and ecological aspects of *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) in the western and central Mediterranean Sea. *Sci Mar* 68: 117-127
- Schlotterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-371
- Schlötterer C, Pemberton J (1994) The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. *EXS* 69, 203-214
- Schlötterer C, Vogl C, Tautz D (1997) Polymorphism and locus specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics*, 146: 309-20
- Seridji A (1971) Contribution a l'étude des larves crustacés décapodes en baie d'Alger. *Pelagos*, 3: 1-107
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462
- Stern C (1943) The Hardy–Weinberg law. *Science*, 97: 137-138
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research* , 17: 6463-71
- Tautz D, Schlötterer C (1994) Simple sequences. *Current Opinion in Genetics Development*, 4: 832-837
- Tavares C, Martin JW (2010) Suborder Dendrobranchiata Bate, 1888. In: Schram FR, von Vapule Klein JC (Eds.) *Speciation and its consequences*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA: 3-27
- Templeton AR, Robertson RJ, Brisson J, Strasburg J (2001). Disrupting evolutionary processes: The effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 5426-5432
- Tobar R, Sardà F (1987) Analisis de la evolució de las capturas de gamba rosada *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) en los últimos decenios en Cataluña. *Informes Tecnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras*, Barcelona 142, 20
- Tracey ML, Nelson K , Hedgecock D, Shleser RA, Pressick ML (1975) Biochemical genetics of lobster: genetic variation and the structure of American lobster (*Homarus americanus*) populations. *J. Fish. Res. Board Can.*, 32: 2091–2101

- Waples RS, Punt AE, Cope JM (2008) Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? *Fish Fish*, 9: 423-449
- Ward RD (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420: 191-200
- Ward RD, Grewe PM (1994) Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4: 300–325
- Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388-96
- Weber JL (1990) Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>·(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, 7: 524-30
- Weinberg W (1908). Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahresh. Ver. Vaterl. Naturkd. Württemb*, 64: 369-382. (traduzione in inglese: Boyer, 1963; Jameson, 1977)
- Weir BS (1990) Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Massachusetts, 377
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics*, 15: 323-354
- Zane L, Ostellari L, Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cuzin-Roudy J, Buchholz F e Patarnello T (2000) Genetic differentiation in a pelagic crustacean (*Meganyctiphanes norvegica*: Euphausiacea) from the North East Atlantic and the Mediterranean Sea. *Marine Biology*, 136: 191-199

## **RINGRAZIAMENTI**

Per la realizzazione di questa tesi devo fare una distinzione tra il lato italiano e quello catalano, che mi hanno aiutata entrambi durante la stesura e mi hanno fornito un appoggio culturale ed emotivo.

Per il lato italiano desidero ringraziare il dott. Ferruccio Maltagliati, che innanzitutto mi ha fornito i contatti necessari per intraprendere l'avventura spagnola, ma in special modo per avermi guidata nel mondo dell'analisi statistica, per aver avuto la pazienza di correggere le svariate bozze dei capitoli e per essere sempre stato disponibile a chiarimenti dell'ultimo momento.

Ringrazio il prof. Alberto Castelli per la sua disponibilità, il suo appoggio, l'interesse dimostrato e i diversi consigli.

Un ringraziamento per la prof.ssa Isabella Sbrana e il dott. Fabrizio Erra per le indicazioni durante la stesura della tesi.

Por el lado catalano deseo decir gracias a la profesora Marina Roldan, por darme la bienvenida en Girona y en su laboratorio, por sus valiosos consejos, hacerme entender como se trabaja en equipo y por introducirme a los pinchos vascos. Un gracias a todo el LIG, en particular a la doctora Sandra Heras que me ha introducido a las técnicas moleculares y a todos los becarios que me atendieron como si hubiera siempre sido una de ellos !